

FACULTAD DE CIENCIAS
GRADO EN BIOLOGÍA
TRABAJO FIN DE GRADO
CURSO ACADÉMICO 2017-2018

TÍTULO:

Cambios en la composición del floema de plantas de *Capsicum annuum* L. en respuesta a la presencia de pulgón (*Myzus persicae* Sulzer)

AUTORA:

Sandra Santonja Serra

Índice

Resumen.....	4
Agradecimientos.....	5
1 Introducción	6
1.1 Contexto	6
1.2 El pulgón	6
1.2.1 Características nutricionales del floema:	7
1.2.1.1 Macronutrientes.....	8
1.2.1.2 Micronutrientes e iones	9
1.2.2 El floema como fuente de alimentación para los pulgones	10
1.2.3 Método de alimentación	11
1.3 Planta.....	13
1.3.1 Respuesta de la planta.....	14
1.3.1.1 Reconocimiento del pulgón.....	15
1.3.1.2 Interacción con el pulgón	16
1.3.1.3 Defensas frente al ataque del pulgón.....	17
1.3.1.4 Alteraciones en la transcripción génica como respuesta	17
1.3.1.5 Alteraciones en el metabolismo primario como respuesta	18
2 Realización del proyecto.....	22
2.1 Objetivos del proyecto	23
2.2 Hipótesis	23
2.3 Cronograma.....	23
3 Material y Métodos	23
3.1 Búsqueda bibliográfica	23
3.2 Cultivo.....	24
3.3 Infestación	26
3.4 Extracción del floema	28
3.5 Análisis de carbohidratos	31
3.6 Análisis de aminoácidos.....	32
4. Resultados	36
4.1 Prueba.....	36
4.1.1 Aminoácidos libres	37
4.1.2 Carbohidratos	40
4.2 Ensayo final.....	41

4.2.1 Aminoácidos libres	42
4.1.2 Carbohidratos	46
5. Discusión	50
6. Conclusiones	52
7. Bibliografía	54
8. Anexos.....	56
8.1 Prueba Aminoácidos	56
8.1.1 Rectas patrones de los aminoácidos.....	56
8.1.2 Concentraciones aa.....	63
8.1.3 Resultados estadísticos (SPSS)	64
8.2 Ensayo Azúcares.....	71
8.2.1 Rectas patrones de los azúcares	71
8.2.2 Concentraciones totales	73
8.2.3 Resultados estadísticos	74

Resumen

Los pulgones constituyen unas de las plagas más importantes que afectan a los cultivos. Su principal problema radica en su hábito de alimentación: el contenido del floema de las plantas, hábito al que tanto fisiológica como morfológicamente se encuentran muy bien adaptados. Los pulgones penetran las hojas hasta llegar al floema de tal forma que el daño mecánico que producen es mínimo y las plantas tardan más en responder ante ellos. En este estudio he trabajado con *Myzus persicae* (Sulzer) y con *Capsicum annuum* L., y estudiaré las alteraciones que provoca el pulgón en las concentraciones de carbohidratos y de aminoácidos libres en el floema de la planta. Se cuentan con 4 tratamientos de tiempos distintos a la exposición de la planta al pulgón: 96, 48, 24 y 3 horas. Lo que se busca con esto es ver la cantidad y el tiempo de respuesta que tiene las plantas frente a este fitófago. Para la cuantificación de los compuestos se va a emplear el método de exudación mediante EDTA, y se van a realizar análisis mediante cromatografía líquida iónica para carbohidratos, y UHPLC-MS/MS para aminoácidos.

Palabras clave: Exudación; relación insecto-planta; defensas vegetales; UHPLC-MS/MS

Abstract

Aphids are actually one of the major crop pests. Their principal threat comes from their feeding habit, the phloem, to which they are perfectly adapted, both physiologically as well as morphologically. Aphids penetrate leaves until they find the phloem cells, in such a way that the mechanical damage caused to the plant tissues is minimum and therefore the host plant takes more time to respond to them. In this study I have worked with *Myzus persicae* (Sulzer), and *Capsicum annuum* L. as host plant. I have centered the work in the search for alterations caused in the content of carbohydrates and free amino acids of plant phloem sap as a consequence of the presence of the aphids. The study is divided into four different treatment times that the plant was exposed to the aphid: 96, 48, 24 and 3 hours and I look for the quantity and the response time that plants against this predator. For the quantitation of these components I have used the phloem EDTA exudation method to extract phloem sap and ionic liquid chromatography and UHPL-MS/MS for carbohydrate and free amino acid analysis, respectively.

Key words: exudation; plant-insect relationship; plant defences; UHPLC-MS/MS.

Agradecimientos

A José Luis Casas por toda la atención y ayuda dedicada en la realización de este proyecto.

A Vicky Florencio Ortiz por su ayuda y compañía durante toda la realización de este trabajo.

A Susana Sellés Marchart y a Ana Paula Beltrá Alba, las personas encargadas de que los análisis de los Servicios Técnicos de Investigación de la Universidad de Alicante y su comprensión fueran posibles.

A mi familia y amigos por todo su apoyo y consejos.

1 Introducción

1.1 Contexto

En la actualidad, la gran mayoría de las materias primas de origen vegetal que sustentan la alimentación humana provienen de cultivos ya sean al aire libre o en invernaderos. Esto nos da una idea de la importancia que ha tenido y tiene la agricultura para ofrecer alimentos de origen vegetal a la humanidad, además de generar otros beneficios derivados como alimentación para ganado, entre otros, que también repercuten notoriamente en la población. De ahí que la salud de los cultivos se haya convertido actualmente en una prioridad mundial.

Es conocido por todos que numerosos factores ambientales como la escasez de agua, las granizadas, las lluvias torrenciales o los desbordamientos de los ríos, etc., condicionan la agricultura limitando la productividad de las cosechas. Evidentemente, los fenómenos naturales son difíciles de controlar y predecir, pero hay otro factor que afecta negativamente a los cultivos y que está presente de una manera más constante, que es el que se va a tratar en este trabajo: las plagas.

Las plagas ya sean de herbívoros o de microorganismos, tienen en común que una vez infestan o infectan a una planta de un cultivo, se pueden propagar sin mucha dificultad a todas las demás, provocando grandes pérdidas en los cultivos. Además, también existe la complicación de que cada familia de organismos que ataca a cualquier estructura del vegetal, contiene un gran número de especies que se comportan, interaccionan y se controlan de forma distinta. Lo mismo ocurre con cada especie vegetal, ya que no responden de la misma manera al mismo depredador. Es el caso de los pulgones, de los cuales hay registradas más de 5000 especies (Elzinga y Jander, 2013), y constituyen una de las plagas más dañinas y frecuentes que afectan a los cultivos en la actualidad (Douglas, 2003; Dogimont *et al.*, 2010; Will y Vilcinskis, 2015).

1.2 El pulgón

La especie con la que he trabajado es *Myzus persicae* (Sulzer) de la familia aphididae, conocido como el pulgón verde del melocotonero. Son polívoros, es decir, se alimentan de diferentes tipos de plantas. Este hecho no es muy común, ya que se ha visto que solo 10 especies se han descrito como tal. Se trata de un fitófago especializado en la alimentación a base de fluidos (floema). Por ello, sus piezas bucales están adaptadas a este tipo de alimentación. Por otro lado, dado que el floema se considera una fuente de alimentación poco adecuada para la gran mayoría de organismos debido a que presenta importantes desequilibrios entre los nutrientes e iones, y por sus altas presiones osmóticas (Douglas, 2003). Por este motivo, los organismos que lo usan como recurso alimenticio, presentan una serie de

adaptaciones para poder complementar su nutrición. Además, otro requisitos para acceder a esta fuente de alimento es que los insectos deben tener un tamaño reducido. Al parecer, los hemíptera son los únicos que usan el floema como la principal o única fuente de recursos (Douglas, 2003).



Fotografía 1: Imagen de un pulgón alado y otro áptero.

1.2.1 Características nutricionales del floema:

El floema es un tipo de tejido cuya función es realizar el transporte de los fotoasimilados desde el lugar donde se obtienen hasta todas las demás estructuras de la planta. Esto implica un transporte a una gran distancia y para ello cuenta con células especializadas, como los elementos cribosos que se asocian a células parenquimáticas y células acompañantes. Los elementos cribosos se caracterizan por las perforaciones que aparecen en su pared, que es lo que les da nombre (Azcón-Bieto y Talón, 2013). Los plastidios del floema no son fotosintéticamente activos y las mitocondrias no son funcionales. Además, el núcleo, el citoesqueleto, los ribosomas y otros orgánulos están ausentes, y los elementos cribosos son incapaces de sintetizar proteínas. Cada elemento criboso es independiente genéticamente y metabólicamente de la célula acompañante, las cuales se encuentran conectadas entre sí por poros denominados plasmodesmos, que permiten el transporte de proteínas de bajo peso molecular, entre 10-40 kDa (Douglas, 2003).

La presión osmótica en los elementos cribosos es de 0,6-3 MPa, por lo que es una estructura cuyo contenido se somete a presión. Dicha presión experimenta un gradiente entre las estructuras fuente de la planta (las hojas) y los órganos que se convierten en sumidero de nutrientes, que dirige el flujo del floema, el cual se fluye desde los órganos fuente

(mayor presión osmótica) hacia los órganos sumidero (menor presión osmótica). Las implicaciones son dos: la primera es que las concentraciones de solutos del floema en un elemento criboso va disminuyendo progresivamente con la distancia a medida que se aproxima a los sumideros. Y la segunda es que la relación y la dirección de movimiento del floema varía con la posición de la planta (según la altura de las hojas) y con el momento del día, atendándose según la fuerza del flujo y de los sumideros. Por tanto, los pulgones y otros depredadores, cuentan con una disponibilidad de nutrientes muy distinta según estos factores (Douglas, 2003).

1.2.1.1 Macronutrientes

Los carbohidratos son el componente dominante del floema, siendo la sacarosa el azúcar más abundante en la mayoría de las plantas. Este hecho puede deberse a su gran estabilidad química, dado que es un azúcar no reductor y a su baja viscosidad en soluciones concentradas. La concentración de azúcares del floema es un orden de magnitud mayor que en la concentración del citoplasma de las otras células, lo que requiere de un transporte activo de azúcares (Douglas, 2003).

Por otro lado los polioles, que son alcoholes de azúcares, también son componentes importantes a la contribución de carbohidratos en el floema, sobre todo durante la noche, y su concentración absoluta es elevada durante el estrés hídrico y de elevada temperatura (Douglas, 2003).

Los principales componentes nitrogenados provienen de los aminoácidos libres, con una concentración entre 50-800 mM. Por otra parte, el nivel de amonio es muy bajo y el nivel de nitratos es indetectable. Hay 20 aminoácidos proteicos. Normalmente los 20 aminoácidos son detectables a concentraciones menores de 1 nM. La concentración de aminoácidos esenciales, es decir, los que los animales no pueden sintetizar *de novo*, es bajo, suponiendo un 10-30% del total de aminoácidos proteicos. Los aminoácidos esenciales para los insectos son 9: histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina. Pero la composición y concentración en el floema son muy variables. Aun así, la concentración del floema y del citoplasma de las hojas del mesófilo es muy parecida. Lo que supone que el transporte por los elementos cribosos es pasivo (Douglas, 2003).

Los aminoácidos no proteicos, péptidos y otros componentes nitrogenados también se han observado en el floema. Sobre todo los aminoácidos sulfurados como la cistina, se transporta por el aminoácido no proteico S-metilmetionina, o el tripéptido glutatión (glutamato-cistina-glicina) que transporta a la metionina. Ambos elementos representa el 3,5% del transporte de sulfuros. Otros componentes como las poliaminas y los ureidos se han identificado en el

floema de varias plantas (Douglas, 2003). En el caso del transporte de nitrógeno, el aminoácido predominante suele ser uno de los cuatro siguientes: aspartato, glutamato, asparagina o glutamina (Douglas, 2003).

En los exudados del floema se han encontrado entre 150 y 200 proteínas diferentes, normalmente con un peso molecular pequeño 10-40 kDa y con concentraciones totales realmente bajas, 0,1-2 µg/µL. Se han detectado en el floema enzimas que participan en la glucólisis, enzimas que intervienen en el equilibrio redox de la célula como glutatión reductasa y también proteínas de defensa. (Douglas, 2003)

Los lípidos y esteroides se encuentran en bajas cantidades en el floema. No obstante se han realizado pocos análisis del contenido de esta macromolécula en los elementos cribosos. En algunos estudios se han detectado ácidos grasos libres, y en menor concentración, triacilgliceroides, fosfolípidos, esteroides y ésteres de cera en las exudaciones con EDTA de *Brassica napus*. El ácido graso predominante es el ácido palmítico (Douglas, 2003).

1.2.1.2 Micronutrientes e iones

Las sustancias inorgánicas totales que se pueden encontrar en el floema suponen entre 1-5 g/L. Los componentes inorgánicos mayoritarios son el potasio (K^+), con una concentración de entre 50 y 150 mM y el fosfato (PO_4^{3-}) a concentraciones algo más bajas: 10 – 50 mM. El fosfato y otros aniones como el bicarbonato tienen el papel de mantener el equilibrio de cargas, manteniendo el pH del floema entre valores de 7,3 y 8. Otros iones en el floema son el magnesio (Mg^{2+}) con concentraciones de 5 mM y el cloro (Cl^-) sobre 10 mM. La relación de $Na^+:K^+$ del floema es en muchos casos baja, entre 1:5 o 1:10. Es sabido que el Na^+ es un nutriente esencial para la planta, sin embargo niveles muy elevados del mismo, son tóxicos para la mayoría de las especies de plantas. Aun así, el sodio es un componente móvil del floema y su concentración dentro de floema se eleva en periodos de crecimiento cuando la planta está sometida a condiciones salinas (Douglas, 2003).

En el caso de los compuestos nitrogenados como el nitrato y el amonio (NO_3^- y NH_4^+) o los sulfurados como el sulfato (SO_4^{2-}), se presentan en concentraciones muy bajas, muchas veces indetectables. Estos tipos de elementos son transportados normalmente como componentes orgánicos (Douglas, 2003).

La concentración de calcio es también baja, sobre 10 µM – 3 mM de los cuales un 10-30 µM se encuentra libre y el resto quelado (Douglas, 2003). También se han detectado micronutrientes como el hierro, manganeso, zinc, cobre y molibdeno. Además del boro que se considera inmóvil en el floema, pero su movilidad se ve potenciada por la presencia de polioles en el floema (Douglas, 2003).

Aparte de los diferentes nutrientes mencionados anteriormente, el floema también contiene diferentes elementos y compuestos de defensa frente a los herbívoros, bacterias, hongos y virus.

1.2.2 El floema como fuente de alimentación para los pulgones

El floema presenta una relación azúcares:aminoácidos, aminoácidos no esenciales:esenciales y $K^+ : Na^+$ alta, lo que en general lo convierte en un recurso para obtener los nutrientes muy poco común en los animales (Douglas, 2003). Sin embargo, como se ha mencionado antes, la dieta de los pulgones se basa en gran medida en el contenido del floema, y algunas especies lo consumen de forma estrictamente. Para ello, los pulgones cuentan con un tracto digestivo muy bien adaptado anatómica, bioquímica y fisiológicamente a este tipo de dieta, en el que además se ha descrito la simbiosis obligada con una bacteria del género *Buchnera*, la cual solo se conoce en los áfidos (Douglas, 2003). Estas bacterias son intercelulares y ocupan el 10% del peso del organismo, además las células del género *Buchnera*, suponen un 90% o más del número total de las células procariotas.

Myzus persicae tiene una eficacia de asimilación de aminoácidos entre un 64-70%. Los aminoácidos esenciales son aquellos que el organismo no puede sintetizar *de novo*, en el caso de los áfidos son 9 aminoácidos esenciales y 11 aminoácidos que sí que son capaces de sintetizar (Douglas, 2003). En el caso de los humanos, estos 20 aminoácidos son esenciales. Estos insectos obtienen los nutrientes de forma directa y a través de la simbiosis con el microorganismo. Esta diferencia con los humanos se debe a la simbiosis con *Buchnera*, ya que le proporciona parte de los aminoácidos. Esta afirmación se ve apoyada por el hecho de que la eliminación de *Buchnera* del tracto digestivo de *Myzus persicae*, provoca que el pulgón necesite los 20 aminoácidos esenciales. En el genoma de *Buchnera* se encontraron genes para la síntesis de los 9 aminoácidos esenciales y todos los no esenciales aparte de la cisteína (Douglas, 2003). Los aminoácidos que le proporciona *Buchnera* son distintos dependiendo de la composición de la ingesta del pulgón. Se ha visto que el pulgón tiene control de la síntesis de aminoácidos por parte de la bacteria aportándole los precursores a través de la membrana de las células de *Buchnera* (Douglas, 2003).

Los aminoácidos tienen funciones importantes además de formar parte de la estructura de las proteínas. Muchos de ellos son precursores de neurotransmisores o de neurohormonas. Los 20 aminoácidos son constituyentes de la hemolinfa y además se encuentran en concentraciones detectables, los cuales son necesarios para la osmoregulación. Algunos de los aminoácidos de la hemolinfa de los áfidos como el ácido glutámico, por ejemplo, tienen una

elevada consumición del mismo en la respiración. Al contrario de los azúcares que se consumen muy poco en la respiración (Douglas, 2003).

El colesterol, al igual que en la mayoría de los animales, es el esteroide predominante. Esta biomolécula es muy importante para la formación de la bicapa lipídica de las membranas y como precursor de los ecdisteroides. El colesterol lo adquieren a partir del fitoesterol que ingieren del floema. Los pulgones consiguen todo el esteroide necesario para sus requerimientos nutricionales del floema de la planta, lo que indica que solo con la ingesta del floema es suficiente (Douglas, 2003).

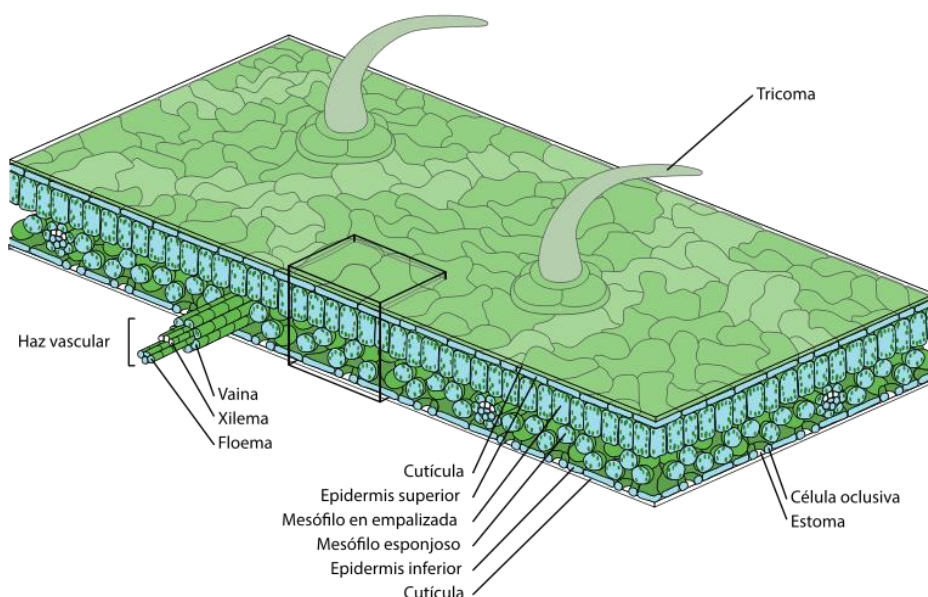


Imagen 1: Esquema de las estructuras tisulares de una hoja (tomada de: https://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Leaf_Structure_es.svg).

1.2.3 Método de alimentación

Los pulgones se alimentan del contenido del floema, para lo cual su aparato bucal o estilete se encuentra perfectamente adaptado para acceder a él (Giordanengo *et al.*, 2010). Normalmente la penetración del estilete es intracelular, es decir, transcurre entre las paredes celulares de dos células contiguas, lo que indica que el daño “real” que infringe el pulgón es mínimo en la planta hospedadora. El tiempo que precisan los pulgones para esta primera etapa es de unos 20 minutos y más de una hora para localizar el elemento criboso e iniciar la ingesta (Douglas, 2003). Los pulgones encuentran el elemento criboso por los elementos químicos internos de las células perforadas, como el gradiente de sacarosa o el pH (Giordanengo *et al.*, 2010). Estudios con EPG (*Electrical Penetration Graph*) han demostrado que los pulgones no ingieren siempre los nutrientes del primer elemento criboso que entran, sino que pueden realizar otras perforaciones hasta la definitiva (Douglas, 2003). Esto se apoya

con las diferentes discriminaciones que realizan, ya sean hojas, raíces o tallos; el haz o el envés; según la edad de la planta entre otros (Douglas, 2003). Sin embargo parece que no discriminan según la composición nutritiva del floema, ya que esta varía según el momento del día. Esta afirmación viene dada porque en varios experimentos se ha visto que no hay mucha diferencia entre los exudados de los estiletes y la exudación del floema, concluyendo que los pulgones no basan su selección del elemento criboso en la concentración de aminoácidos (Douglas, 2003). La picadura del insecto no ocasiona daño en el tejido de la hoja, aunque puede provocar cambios en la planta a nivel tanto génico como bioquímico (Douglas, 2003).

En el momento de la penetración los pulgones secretan dos tipos de saliva, una de gel para facilitar la penetración del mismo, con la cual se produce un túbulo que se endurece rápidamente alrededor del estilete hasta el apoplasto y también contribuye a sellar la perforación ocasionada en la membrana celular. La vaina formada confiere estabilidad, lubricación y protección frente a los diferentes elementos químicos de defensa por parte de la planta. Esto es posible ya que la saliva contiene enzimas desintoxican los radicales libres (Will y Vilcinskis, 2015). Acto seguido secretan un segundo tipo de saliva más acuosa por el túbulo formado por la saliva gelificada mientras empiezan a alimentarse del floema. Este segundo tipo de saliva contiene agentes quelantes de calcio, principalmente proteínas, con lo que evitan el flujo de calcio, el cual es crucial para el cierre de heridas ocasionadas en la planta. (Elzinga y Jander, 2013; Will y Vilcinskis, 2015; Giordanengo *et al.*, 2010). Además, también contiene enzimas que impiden el cierre de los elementos cribosos y provocan la degradación de la pared celular (Giordanengo *et al.*, 2010). Estudios indican que *Myzus persicae* es una de las especies que más proteínas tiene (Dogimont *et al.*, 2010). La saliva gel solo se secreta en el momento de la penetración, sin embargo la acuosa se segrega antes y durante de forma continua de la ingesta (Douglas, 2003; Will y Vilcinskis, 2015).

Como ya dije anteriormente, el floema en los elementos cribosos está sometido a una presión positiva, y esto también provoca que los pulgones puedan ingerir pasivamente los nutrientes. Esto no quiere decir que estos insectos no tengan control de la ingesta, ya que lo pueden regular con la musculatura de la cabeza (Douglas, 2003). Una vez han penetrado el estilete y empiezan la ingesta, pueden permanecer horas succionando de forma constante del mismo elemento criboso. Varios estudios estiman que el volumen que los estiletes pueden exudar, ronda el 1 μL de floema por hora. En concreto *Myzus persicae* puede ingerir un 10% de su peso corporal por hora (Douglas, 2003). No obstante el volumen ingerido varía dependiendo de las especies de insectos y de plantas y de la concentración de sacarosa en el interior del floema. Se ha observado que especies como *Myzus persicae*, presentan respuestas

compensatorias de durante la ingesta, con las cuales al detectar una baja presencia de sacarosa, se incrementa la velocidad de ingesta, adquiriendo más nutrientes (Douglas, 2003).



Fotografía 2: *Myzus persicae* comiendo a través de su estilete en una hoja de *Capsicum annuum* L.

1.3 Planta

La planta de la cual se va a realizar el estudio se trata de *Capsicum annuum* L, perteneciente a la familia de las Solanáceas.



Fotografía 3: Plantas de *Capsicum annuum* L. utilizadas durante la realización del trabajo.

1.3.1 Respuesta de la planta

Las plantas al ser organismos sésiles, están expuestas constantemente al ataque de herbívoros y otros patógenos. Por este motivo han desarrollado una gran variedad de adaptaciones defensivas que varían en función de la especie (Mithöfer y Boland, 2012). Las funciones de estas defensas consisten en dificultar y alterar la alimentación, el crecimiento, el desarrollo, la salud, el comportamiento y la fertilidad del insecto (Mithöfer y Boland, 2012; Saguez *et al.*, 2013; Smith y Boyko, 2007). Para conseguir estos efectos, lo hacen mediante disruptores de membrana inhibidores de nutrientes y de transporte iónico, inhibiendo los procesos de transcripción, inhibiendo el metabolismo o alterando el control fisiológico y hormonal (Mithöfer y Boland, 2012). Estas defensas pueden estar presentes de forma constitutiva en la planta, es decir, que se encuentran a lo largo de todo el ciclo vital de esta, a la gran parte del tiempo, independientemente de los ataques; o bien, pueden ser inducidas por amenazas bióticas o abióticas (Goggin, 2007; Howe y Jander, 2008; Mithöfer y Boland, 2012; Thompsom y Goggin, 2006; Zhou *et al.*, 2015). Normalmente las respuestas inducibles suelen ser proteínas, o metabolitos que se encuentran en bajas concentraciones, y antes la presencia de la amenaza, incrementan su concentración (Zhou *et al.*, 2015). La naturaleza de las defensas son tanto físicas, (tricomas, espinas o paredes celulares más gruesas), como químicas (formación de sustancias antinutritivas, repelentes o incluso tóxicas)(Howe y Jander, 2008; Mithöfer y Boland, 2012). Todos estos métodos de defensa, se consideran como **defensas directas**, ya que se encargan de paliar eliminar o reducir la presencia del insecto por ellas mismas. Además, las plantas son capaces de formar sustancias de carácter volátil que no solo pueden ejercer un papel de defensa directa (por ejemplo como disuasorio o repelente), sino también atrayendo a depredadores o enemigos naturales frente a sus atacantes. Esta defensa se considera **indirecta**. Entre las defensas inducidas por los pulgones, tiene importancia los diferentes metabolitos primario y secundarios, y las transcripciones asociadas a la modulación de las rutas de biosíntesis hormonales de los tres compuestos más implicados en las defensa, que son el ácido jasmónico, el ácido salicílico y en segundo plano el etileno (Goggin, 2007; Thompsom y Goggin, 2006). Aunque no son las únicas hormonas y rutas que influyen, en menor medida también están implicados, el ácido abscísico, el ácido giberélico, el ácido nítrico y las auxinas. (Guerrieri y Digilio, 2008; Smith y Boyko, 2007). Estos compuestos permiten el desarrollo directo de químicos defensivos frente a los pulgones o diferentes estreses (Smith y Boyko, 2007). Algunos de ellos, como el ácido salicílico, se ha visto que sirve para atraer a depredadores y parasitoides (Guerrieri y Digilio, 2008). Por si esto fuese poco, las defensas o alteraciones ocasionadas por la plaga pueden ser tanto **sistémicas** o **locales** (Howe y Jander, 2008; Smith y Boyko, 2007). Y pueden darse a nivel genético, transcripcional,

fisiológico, metabólico o morfológico (Schwachtje y Baldwin, 2008; Smith y Boyko, 2007). Otra posible defensa se encuentra mediada por la calmodulina, que permite, por medio del calcio, la defensa y la hipersensible muerte celular, frente a *M. persicae* (Smith y Boyko, 2007). Además, el hecho de que la saliva de los pulgones contenga quelantes de calcio supone un papel muy importante en la resistencia o susceptibilidad de la planta (Thompson y Goggin., 2006), ya que el calcio actúa como segundo mensajero de muchas rutas de señalización (Howe y Jander, 2008).

Aunque a partir de lo ya indicado parece claro que las plantas disponen de diversos mecanismos de defensa frente a las amenazas, la situación real es aún más compleja como consecuencia de sinergias e interacciones que ocurren entre muchas fitohormonas y que dependen además de la especie de la planta, de la especie del pulgón y del tipo de daño que se ha ocasionado. (Howe y Jander, 2008; Thompson y Goggin, 2006). Esto amplifica mucho más las opciones de las plantas en lo que a defensa respecta (Smith y Boyko, 2007). De hecho, son capaces de sintetizar más de 200.000 componentes a modo de metabolitos específicos defensivos. Además, la plasticidad metabólica de las defensas químicas, depende en parte de otras condiciones ambientales (Mithöfer y Boland, 2012). A pesar de las similitudes de las respuestas entre las diferentes plantas, los mecanismos de defensa y señalización son únicos y específicos entre las interacciones del pulgón y la planta (Smith y Boyko, 2007). Aunque las plantas sean capaces de enfrentarse a los patógenos y a los insectos, esto supone un estrés para la planta, ya que tiene que destinar la energía a la defensa, en vez de a la reproducción y al crecimiento y desarrollo (Mithöfer y Boland, 2012; Schwachtje y Baldwin, 2008; Zhou *et al.*, 2015).

1.3.1.1 Reconocimiento del pulgón

El método de alimentación de los pulgones, es mucho más preciso y selectivo que el de otros insectos que muerden la hoja. Esto es debido a que en el momento en el que penetran la hoja con el estilete, son capaces de analizar o reconocer la composición del floema, lo que les permite evadir los diferentes componentes aleloquímicos e indigestibles, los cuales son más abundantes en otros tejidos (Guerrieri y Digilio, 2008). Por medio de las antenas son capaces de detectar odorantes en la superficie de la epidermis, y con la penetración del estilete, adquieren información sobre la fitoquímica y los componentes anti alimentarios de la planta, determinado que el pulgón pueda decidir si acepta o rechaza la planta (Saguez *et al.*, 2013).

Es importante tener en cuenta, que no todos los daños que puede sufrir la planta son ocasionados por depredadores, sino que los factores externos también pueden dañar los

tejidos. Por este motivo, las plantas deben diferenciar qué ha provocado el estímulo de la zona afectada (Howe y Jander, 2008).

1.3.1.2 Interacción con el pulgón

Puesto que hay una coevolución presente entre las plantas y sus posibles depredadores, ya sean herbívoros, bacterias, hongos o virus que interactúan con las plantas, estas elaboran diferentes respuestas en función del tipo de alimentación y el daño que este ocasiona, y de la propia presencia del atacante (Howe y Jander, 2008; Schwachtje y Baldwin, 2008).

No obstante para que la planta sea capaz de efectuar una respuesta frente a la alimentación del pulgón se cree que deben darse distintos procesos basados en reconocimientos de genes por ambas partes. Primero, actúan los genes de la alimentación del pulgón, después de activan los genes defensivos de la planta, y en último lugar los genes de resistencia del pulgón frente a esas defensas (Smith y Boyko, 2007).

Las distintas respuestas de la planta se desencadenan según el tipo de daño o alteraciones que recibe la planta, como el daño físico o el daño químico. Como ya se ha mencionado, la especie *M. persicae* al igual que otros de su misma familia, tiene un hábito alimentario que produce daños mecánicos muy pequeños en comparación con otros métodos de alimentación que desgarran el tejido foliar (Guerrieri y Digilio, 2008; Howe y Jander, 2008). Aun así, las plantas reaccionan al picotazo intentando cerrar la herida. El problema es que la saliva que secretan los pulgones, contienen proteínas quelantes de calcio que impiden la oclusión, e incluso la pueden revertir (Goggin, 2007; Guerrieri y Digilio, 2008). El hecho de que la picadura no ocasione prácticamente daño es un problema debido a que el tiempo que le toma a la planta para darse cuenta de la infestación, es mucho más largo que en el caso del ataque de otros insectos, por lo que le es posible que tarde más en responder (Guerrieri y Digilio, 2008). Aun así, la respuesta frente a la alimentación de los pulgones es rápida. En el caso de *M. persicae* induce una respuesta foliar desde el momento de la alimentación que se inicia en menos de 2 horas, y dura unas 48 horas (Smith y Boyko, 2007). Otro problema que ocasiona el poco daño es que la respuesta local se limita solamente al área afectada y esta solamente corresponde a unas pocas células y tejidos, pero es suficiente para provocar: interrupciones en la pared celular, en la membrana plasmática, y en las células, parenquimáticas, mesófilas y epidérmicas (Thompson y Goggin, 2006).

Al poco tiempo de la picadura se acumula callosa en los espacios apoplásmicos con la finalidad de reducir o detener el flujo. Pero esto solo ocurre en el momento en el que se retira el estilete. Debido a las sustancias de la saliva de los pulgones y a que pueden permanecer con el estilete dentro del tejido durante horas, inhiben la oclusión de los elementos cribosos, la

acumulación de calosa y la coagulación de las proteínas que circulan en el floema (Saguez *et al.*, 2013).

Varios estudios han concluido que la composición del floema también se puede ver afectada por la presencia de virus, ocasionando un incremento de los carbohidratos y de los aminoácidos. Esto desemboca en una mayor calidad del floema para la nutrición de los pulgones. Por el contrario, la planta también incrementa la resistencia y la síntesis de componentes de defensa (Saguez *et al.*, 2013).

Está claro que los pulgones ocasionan cambios en los elementos cribosos tanto en el contenido químico como a nivel fisiológico (Smith y Boyko, 2007).

1.3.1.3 Defensas frente al ataque del pulgón

Las primeras respuestas que desatan los diferentes ataques a la planta son comunes y se caracterizan por la fosforilación de proteínas, la despolarización de las membranas celulares, el flujo de calcio y la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS), a nivel local y sistémico (Saguez *et al.*, 2013; Thompsom y Goggin, 2006). La producción del ROS es un problema también para la planta, por lo que debe encontrar un equilibrio entre la síntesis de estos compuestos y entre las enzimas detoxificadoras de los mismos, para minimizar los daños que se pueden ocasionar en el tejido de la planta (Smith y Boyko, 2007). La liberación de las ROS son útiles a nivel local porque ofrecen una respuesta hipersensible (Thompsom y Goggin, 2006). La segunda línea de defensa se trata del sistema inmunitario innato de la planta que detecta las moléculas efectoras del daño ocasionado (Howe y Jander, 2008).

Los pulgones en su saliva tienen enzimas con actividad peroxidasa o polifenoloxidasa que provocan una conversión de los compuestos fenólicos producidos por las plantas en derivados que son menos tóxicos para ellos (Howe y Jander, 2008; Saguez *et al.*, 2013).

1.3.1.4 Alteraciones en la transcripción génica como respuesta

Las plantas presentan unos genes de resistencia asociados al ataque de los pulgones que son los genes R (Goggin, 2007; Howe y Jander, 2008; Smith y Boyko, 2007). Estos forman parte de la resistencia innata de la planta y la media (Thompsom y Goggin, 2006) y se consideran como un tipo de sistema molecular de vigilancia sistémica que permite a ciertos genotipos de plantas reconocer e impedir plagas que son capaces de burlar las resistencias. Se han llegado a caracterizar numerosos genes R (Goggin, 2007). La respuesta local es bastante rápida, y bloquea o reduce de forma considerable el establecimiento inicial de la plaga (Thompsom y Goggin, 2006). Pero no solo realiza esta función, sino que además en el momento en el que el pulgón establece contacto con la planta reduce la ingesta de estos sobre el floema (Thompsom y Goggin, 2006).

Durante la activación de genes de respuesta las plantas producen diferentes activadores que inician la expresión de genes en diversas rutas de señalización defensivas (Smith y Boyko, 2007).

Se ha visto que la sobreexpresión del gen regulador de la síntesis de la hormona sistemina, inducido por el daño mecánico ocasionado por el ataque de insectos masticadores, potencia los atrayentes de los volátiles liberados por la planta para atraer a parasitoides (Guerrieri y Digilio, 2008).

El método de alimentación de los pulgones provoca una reprogramación a nivel transcripcional en las plantas huéspedes para proporcionar diferentes respuestas, las cuales son cualitativamente y cuantitativamente distintas de las otras a los demás insectos o patógenos (Thompson y Goggin, 2006). Las diferentes naturalezas de los daños ya sean químicos o mecánicos, provocan una gran cantidad de cambios en las plantas, y muchos de ellos son regulados a nivel transcripcional. Numerosos estudios sustentan que los insectos que se alimentan de floema causan un menor impacto en la transcripción que los insectos que causan heridas (Thompson y Goggin, 2006).

No obstante, la transcripción de genes no solo está modulada para defenderse de su atacante, sino que también se encarga de mantener la homeostasis. Por ejemplo, la ingesta de floema causa estrés hídrico por lo que le transcriben proteínas y otros compuestos involucrados en mantener el potencial hídrico, como las acuaporinas, diversas proteínas intrínsecas, entre otras (Thompson y Goggin, 2006).

1.3.1.5 Alteraciones en el metabolismo primario como respuesta

El floema contiene numerosas proteínas y metabolitos que permiten a la planta defenderse de los pulgones. Además, los pulgones afectan al metabolismo de la planta para mejorar la composición del floema, sobre todo con la alteración del metabolismo del nitrógeno. Consecuentemente, esto provoca que la planta responda con una reorganización de los nutrientes. Por otra parte, también afectan al metabolismo vegetal en varios aspectos, como alterando la actividad fotosintética, el crecimiento de la planta, modificaciones en la pared celular, produciendo metabolitos secundarios, produciendo compuestos involucrados en el estrés oxidativo, la señalización de rutas metabólicas, el transporte de agua, la homeóstasis, la biosíntesis de vitaminas, la asimilación del carbono y movilizándolo el carbono y el nitrógeno (Saguez *et al.*, 2013; Thompson y Goggin, 2006; Zhou *et al.*, 2015). La mayoría de estas respuestas se dan en el tejido del floema (Thompson y Goggin, 2006). Por ejemplo, en el caso de *M. persicae*, es capaz de incrementar las actividades sistémicas de la glutamina sintasa y glutamato deshidrogenasa, con el fin de movilizar los nitratos y azúcares (Saguez *et al.*, 2013).

Por otra parte, también afecta a la glutamato sintasa, ya que se trata de una enzima destinada a la respuesta contra el estrés celular (Smith y Boyko, 2007).

Muchos metabolitos primarios tienen función defensiva y se encuentran a niveles muy elevados en el interior de la planta, o se inducen por el estímulo de la alimentación de los insectos (Schwachtje y Baldwin, 2008). Los metabolitos secundarios son compuestos que no son requeridos para el crecimiento normal o para la reproducción y a menudo son exclusivos o característicos de cada linaje de la planta (Howe y Jander, 2008).

Frecuentemente las plantas expuestas a una plaga aumentan su actividad fotosintética. Esto se puede deber a que la síntesis de los componentes defensivos requiere de un aumento de la fijación del carbono, pero también para compensar la disminución del área fotosintética disponible a causa de las posibles lesiones tisulares, e incluso también como consecuencia de una manipulación de los insectos para incrementar la cantidad de nutrientes. Por otra parte, la actividad fotosintética no aumenta en todos los casos, sino que se puede ver reducida. Las causas de su reducción son una elección que realiza la planta entre las defensas y la fotosíntesis, ya que el proceso fotosintético consume mucha energía. Además, algunos insectos causan daños en las hojas, reduciendo el área fotosintética, y puesto que si se ve disminuida, de forma directa, también se reducen los carbohidratos disponibles para los herbívoros. En el caso del incremento de la expresión de los genes de la actividad fotosintética, se ha registrado más en las especies de plantas que son tolerantes a los insectos herbívoros. (Zhou *et al.*, 2015). Los herbívoros que rompen la hoja, suelen condicionar un incremento de la fotosíntesis, y los insectos que se alimentan del mesófilo, tienden a disminuir la actividad fotosintética (Schwachtje y Baldwin, 2008). Aunque los casos más comunes es la reducción de la misma, lo que supone un reto para la planta el poder suplir sus requerimientos energéticos. Una forma de solucionarlo es la movilización de compuestos de reserva y aumentar la actividad catabólica, para conseguir más energía. Se ha visto que de manera local, es decir, en la zona afectada por el ataque, se incrementa la expresión de las invertasas y otras enzimas degradadoras de carbohidratos (Zhou *et al.*, 2015). En el caso de *M. persicae*, su ingesta causa un movimiento de las reservas de manitol. Este compuesto tiene como función responder ante el estrés hídrico que ocasionan los pulgones, ya que para abastecer sus requisitos nutricionales de nitrógeno, absorben mucha cantidad de fluido (Thompson y Goggin, 2006).

La alimentación de *M. persicae* induce la expresión de STA4, un transportador simporte de monosacáridos, el cual interactúa con invertasas para incrementar el importe de carbohidratos y el metabolismo, y de esta manera, provocar una carencia de nutrientes en el lugar de alimentación. Además, los transportadores de monosacáridos también son inducidos por otros productos de carbohidratos y metabolismo durante la ingesta de *M. persicae*. Por lo que

durante la ingesta de *M. persicae*, se expresan genes asociados con el transporte y metabolismo de azúcares, los cuales es probable que se regulen por la retirada de floema durante la ingesta (Smith y Boyko, 2007). Los carbohidratos se tratan del mayor recurso de almacenamiento de energía tanto para los insectos herbívoros como para las plantas. La ingesta de los insectos, causan un incremento del movimiento de los carbohidratos a los lugares donde se encuentra el atacante en varias especies de plantas (Zhou *et al.*, 2015). Es bastante común que las plantas destinen el nitrógeno para sintetizar componentes defensivos, así como el carbono a modo de carbohidrato libre para la síntesis de metabolitos defensivos, a nivel local. Una posible explicación es que la síntesis de carbohidratos, en condiciones de mucha luz, no son muy costosos energéticamente, y los aminoácidos suelen ser un factor limitante en el crecimiento de los insectos, por ello si se transportan por el floema pueden fomentar el crecimiento de los depredadores (Zhou *et al.*, 2015). Los herbívoros inducen una disminución de sacarosa en los tejidos infestados, ya que se trata de un compuesto que también puede participar en la defensa (Schwachtje y Baldwin, 2008; Zhou *et al.*, 2015). No obstante, al igual que hay estudios que muestran la recolocación de carbohidratos, otros muestran un secuestro de estos compuestos (Zhou *et al.*, 2015).

En cuanto a los aminoácidos, son la mayor fuente de nitrógenos en las plantas, no solo tienen como función limitar el crecimiento del insecto, sino también son muy importantes en la síntesis de precursores de metabolitos defensivos. Este hecho implica que el control de la regulación de la biosíntesis de aminoácidos es muy importante en lo que a la defensa respecta. En ambos, casos, tanto a nivel sistémico reorganizando los nutrientes como a nivel local (Zhou *et al.*, 2015). Debido a que son tan útiles, las plantas intentan limitar a los insectos su acceso a estos. Asimismo, se ha visto que la expresión de los genes de la biosíntesis de cisteína (Cys) y de metionina (Met), los cuales son necesarios para las rutas de biosíntesis de aminoácidos y de asimilación de sulfuro, aumentan (Zhou *et al.*, 2015). Por otra parte aumentar la expresión de triptófano (Trp) y de metionina, conlleva una mayor acumulación de metabolitos como los glucosinolatos, y también del propio aminoácido Trp (Zhou *et al.*, 2015; Thompsom y Goggin, 2006). Los glucosinolatos son compuestos sulfatados derivados de la metionina, la fenilalanina (Phe) y el triptófano. En caso de daño celular, estos compuestos son hidrolizados para dar compuestos defensivos (cianatos, nitrilos y epitionitrilos) (Thompsom y Goggin, 2006). Por otra parte, los aminoácidos no proteicos, también tienen función defensiva. En especial, los que tiene una estructura similar a los neurotransmisores, como el GABA, los cuales pueden interactuar con los neuroreceptores de los animales (Mithöfer y Boland, 2012).

Además, los insectos herbívoros inducen cambios en el movimiento de los aminoácidos libres a nivel local y sistémico. El transporte de nitrógeno por el floema está dominado por

cuatro aminoácidos: glutamina (Gln), glutamato (Glu), aspartato (Asp) y asparagina (Asn), estos se encargan de la asimilación del nitrógeno (Zhou *et al.*, 2015). Aunque no suelen estar los cuatro presentes en grandes concentraciones, sino que predomina uno dos de ellos según la especie vegetal. Entonces, también se ve aumentada la expresión de la glutamato sintasa y de la glutamina sintetasa (Zhou *et al.*, 2015). En algunos casos se ha visto que los insectos manipulan la composición de floema, enriqueciéndola incrementando la cantidad de aminoácidos libres. Provocándolo con varias medidas, como el aumento de la biosíntesis de aminoácidos libres; induciendo un mayor grado de senescencia por el cual se incrementa la proteólisis que favorece la liberación de aminoácidos libres y alterando el transporte de nitrógeno por medios de los cuatro aminoácidos mencionados anteriormente. (Zhou *et al.*, 2015). En algunos casos los jasmonatos se pueden conjugar con aminoácidos, entre ellos la isoleucina (Ile), y se ha visto que son importantes en las defensas frente al ataque de orugas y gusanos (Howe y Jander, 2008). La treonina desaminasa se encarga de amplificar los niveles de isoleucina en respuesta a al ataque de los pulgones (Schwachtje y Baldwin, 2008). La isoleucina se produce rápidamente en la zona del ataque y se conjuga con el ácido jasmónico, el cual es un activador de algunas rutas de señalización de defensa (Schwachtje y Baldwin, 2008).

La reorganización de los nutrientes es muy importante por tres causas: como otorgar a las defensas locales sustratos para reforzarlas y alterar el metabolismo vegetal, de forma que se desplazan los metabolitos primarios lejos del sitio de alimentación del depredador. Los motivos que llevan a la planta la removilización no se tiene del todo claros, pero se barajan tres posibilidades: disminuir los nutrientes disponibles para los atacantes; promover la tolerancia del daño, asegurando los recursos para el posterior crecimiento y desarrollo de la planta; y atraer a microorganismos como medida de defensa indirecta (Zhou *et al.*, 2015). La movilización suele darse desde los tejidos más verdes, como las hojas, hasta las raíces (Mithöfer y Boland, 2012; Schwachtje y Baldwin, 2008).

En lo que respecta a la integridad vegetal se puede ver afectada por todos los componentes químicos que se secretan y sintetizan como respuesta, ya que muchos de ellos puede ser tóxicos para la propia planta. Para evitar este problema las sustancias están almacenadas como conjugados inactivos, en forma de glucósidos, los cuales se pueden romper fácilmente activando las hidroxilasas (Mithöfer y Boland, 2012). También con el estímulo de la alimentación del insecto, se elevan las expresiones de la transcripción de diferentes rutas, la fotosíntesis, la fotorespiración, la producción de antioxidantes, la desintoxicación y compuestos encargados del mantenimiento de la homeostasis, como el flujo de nutrientes por el floema. De esta manera se protegen de la autotoxicidad (Smith y Boyko, 2007).

No obstante, también hay indicios de que el pulgón altera el metabolismo primario en su propio beneficio (Zhou *et al.*, 2015).

2 Realización del proyecto

Este trabajo está dividido en dos partes, en primer lugar hice una prueba para ajustar las condiciones del ensayo y probar toda la metodología diseñada. Posteriormente realicé el ensayo definitivo, el cual está dividido en 4 tratamientos según la duración del periodo de tiempo al que la planta está expuesta al pulgón: 96, 48, 24 y 3 horas. Además, en cada tiempo se realizan dos grupos: uno de ellos se corresponde con el control y el otro con los pulgones. En la prueba solo se realizó del tratamiento más largo, el de 96 horas. No obstante, al tratarse de una prueba para poner a punto el experimento final, se hicieron 3 subgrupos: dos controles: uno con las trampas (*clip cages*) utilizadas y el otro sin ellas, y el tercer grupo con los pulgones recluidos en las clip cages.

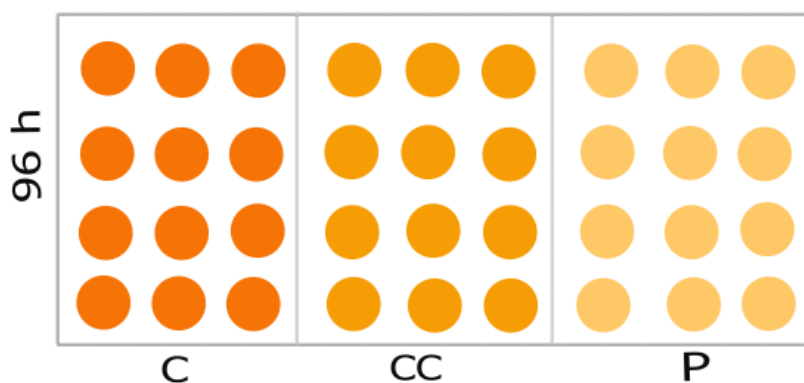


Figura 1: Esquema de la disposición de las macetas durante la prueba de 96 horas. De las 12 plantas de cada grupo, se agruparon de tres en tres al azar, de modo que cada grupo tuviese 4 réplicas. Como de cada planta, se cortan las dos hojas tratadas, cada réplica está compuesta por 6 hojas.

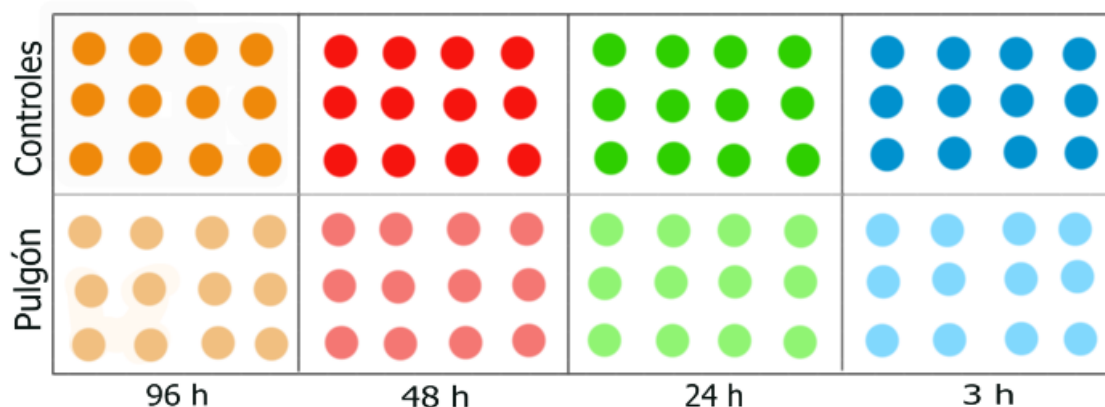


Figura 2: Esquema de la distribución de las plantas para la realización del ensayo final. Al igual que en la prueba, se realizaron grupos de tres en cada una de las diferentes condiciones, teniendo de nuevo cuatro réplicas en cada caso conformadas por 6 hojas.

2.1 Objetivos del proyecto

Este proyecto, pretende estudiar los cambios que ocasiona la infestación con *M. persicae* en los carbohidratos y aminoácidos del floema de *C. annuum* L. y comprobar como esos cambios varían durante los diferentes periodos de exposición del herbívoro

2.2 Hipótesis

En función de los objetivos descritos, he planteado las siguientes hipótesis:

1. La actividad del pulgón no afecta a la composición de los aminoácidos del floema de plantas de *Capsicum annuum* L.
2. La actividad del pulgón no afecta a la composición de los carbohidratos del floema de plantas de *Capsicum annuum* L.

2.3 Cronograma

Cronograma: Distribución en el tiempo de la organización de todas las tareas que se llevaron a cabo para poder completar el trabajo.

Tareas	MESES						
	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio
Busquéda bibliográfica							
PRUEBA	Cultivo						
	Infestación						
	Exudación						
	Procesado de las muestras						
ENSAYO	Cultivo						
	Infestación						
	Exudación						
	Procesado de las muestras						
Análisis estadístico							
Redacción							
Presentación oral							

3 Material y Métodos

3.1 Búsqueda bibliográfica

La primera tarea para realizar este trabajo realizar una búsqueda de la información existente una vez definido el objetivo de mi trabajo. Para ello utilicé Sciencedirect y Pubmed

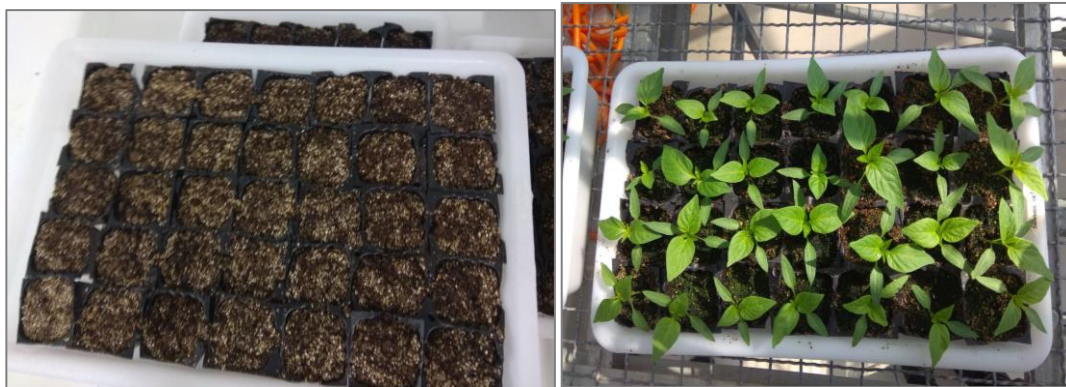
para la búsqueda de artículos científicos, mientras que para la organización y gestión de la bibliografía empleé programas como RefWorks para formar una base de datos.

3.2 Cultivo

Con el fin de poder llevar a cabo los experimentos se realizaron los cultivos para la siembra de las plantas. Como sustrato se empleó una mezcla tipos de tierra con una relación 1:1 de vermiculita y de turba. Después se prepararon las macetas de plástico y se les introdujo la mezcla de sustrato hasta casi cubrir la maceta. Se pusieron entre 2 y 3 semillas de *C. annuum* L. por maceta y se cubrieron con una fina capa de sustrato. Se pusieron en bandejas de 7x5, y se llenaron 3 de estas. Una vez sembradas, se mojaron levemente con agua del grifo para humedecer la tierra, con cuidado de no verter con mucha presión para no hundir las semillas, y de esta manera facilitar que todas tuvieran la misma altura. Además, en una botella se añadió fertilizante y agua del grifo, la cual se vertió en la bandeja hasta cubrir poco más de un dedo de agua. Al haber muchas plantas, este método es más rápido que regarlas una a una. Una vez finalizado todo el proceso, se llevaron al invernadero para que crecieran. El proceso de crecimiento de *C. annuum* L. para poder realizar el experimento, dura entre 4 a 6 semanas.



Fotografía 4: Imagen del invernadero con sus diferentes módulos en los Servicios Técnicos de Investigación de la UA donde se llevaron a cabo los cultivos, las infestaciones y las exudaciones.



Fotografías 5 y 6: Macetas donde se sembraron de 2 a 3 semillas de *Capsicum annuum* L. La fotografía de la izquierda, hace referencia al momento de la segunda siembra y las plantas de la fotografía de la derecha son las que se sembraron en febrero y son las plantas sobre las que se hizo la prueba.



Fotografía 7: Muestra de una planta infestada de pulgones para llevar a cabo cría de estos.



Fotografía 8: Se pueden ver las 8 bandejas con las plantas sobre las que se realizaron los tratamientos. En el momento en que se tomó la imagen, se estaba realizando el tratamiento de las plantas de 96, 48 y 3 horas.

3.3 Infestación

Tanto el cultivo de las plantas de pimiento como la cría de pulgones se realizaron en los invernaderos de los Servicios Técnicos de Investigación de la Universidad de Alicante, utilizando un módulo distinto para cada cosa. La infestación se realiza con *Myzus persicae* en las plantas ya cultivadas. Para evitar que los pulgones se desplazaran por toda la planta o se pasaran a otras, se confinaron en trampas (clip cages) formadas por dos anillos circulares de un material similar al corcho cubiertos por una parte por una malla anti-trips y que se colocan a ambos lados de una hoja quedando unidas entre sí con cuatro clips metálicos (ver fotografías 9 y 10). De cada planta se infestaron dos hojas (las 2 más inferiores) con 20 pulgones en cada hoja. Para ello, se cogieron hojas de la cría del *Myzus persicae* y con la ayuda de un pincel, se fueron cogiendo los pulgones y depositándolos en una de las mitades de las trampas. Después la mitad con los pulgones se pone en el envés y la otra en el haz, y se unen entre ellas con cuatro ganchos metálicos. Las clip cages se ponen muy cerca de la base de la hoja, y se debe ir con precaución de no rasgar la hoja con los ganchos, ya que si la hoja se daña o ya estaba dañada, se debe descartar. Las plantas infestadas se colocaron en una bandeja dentro de una malla para evitar que se contaminen o infesten con otros insectos (ver fotografía 11). En cada bandeja se colocaron 12 plantas con pulgón, y en otra bandeja, 12 plantas con las clip cages en

dos hojas pero sin pulgón, que actuaron como plantas control. Las cuales también se encerraron con otra malla.

Se establecieron cuatro periodos de infestación con el pulgón: 96, 48, 24 y 3 horas. Por lo tanto, se dispusieron 8 bandejas en total (cuatro controles y cuatro infestadas) con 12 plantas cada una de ellas a los distintos tiempos.



Fotografías 9 y 10: Se muestra una planta control de *Capsicum annuum* L. a la cual se le pueden ver las dos clip cages.



Fotografía 11: Interior de una de las mallas que contiene las 12-13 plantas realizando el tratamiento.

3.4 Extracción del floema

Se emplea la técnica de exudación de EDTA. Varios artículos coinciden con que es uno de los mejores métodos para la extracción, a una concentración de 20 mM a pH 7 (King y Zeevaart, 1974; Tetyuk *et al.*, 2013). El pH se ajusta con una solución de KOH 1M, 10 mL (King y Zeevaart, 1974). En primer lugar se para el tratamiento quitando las clip cages de los controles y de las plantas tratadas. Los pulgones se quitan con el pincel y se ahogan en agua. Una vez la hoja sin pulgones se puede proceder a la extracción del floema. Este método consiste en cortar la hoja de la parte más cercana al tallo. Después se ponen inmediatamente en una placa petri con EDTA 20 mL, donde se realizan cortes de 1-2 mm del peciolo (King y Zeevaart, 1974; Tetyuk *et al.*, 2013). Después se transfieren a un Eppendorf con EDTA 20 mM, entre 1-2 horas, ya que es el tiempo que se ha estipulado como óptimo (King y Zeevaart, 1974; Tetyuk *et al.*, 2013; Vashishtha *et al.*, 2013). El Eppendorf, se deja en una cámara húmeda en oscuridad, la cual se puede conseguir con fiambrreras y papel mojado con agua. La superficie de la bancada se cubre con bolsas de basura, donde se colocan las fiambrreras, y se cubren con otra bolsa (Tetyuk *et al.*, 2013; Vashishtha *et al.*, 2013). El EDTA se usa ya que es un quelante de calcio, por lo que impide que la herida provocada al cortar la hoja, se cierre (King y Zeevaart, 1974). Transcurrido ese tiempo, se procede con la exudación propiamente dicha, pasando los tallos por otra placa petri con agua ultrapura, donde se enjuagan un los peciolo para eliminar los posibles restos de EDTA. Ya que se ha visto que puede interferir en los análisis de los aminoácidos mediante HPLC (Tetyuk *et al.*, 2013). Acto seguido, se pasan a otro Eppendorf con agua ultrapura, durante unas 3-4 horas (Vashishtha *et al.*, 2013). Al igual que antes, es necesario que este proceso también se de en oscuridad, por lo que se ponen en las fiambrreras de antes. La exudación no es lineal en el tiempo, es decir, la máxima cantidad de exudación tiene lugar al comienzo y después va disminuyendo a lo largo del tiempo. Cuando ha transcurrido el tiempo pasado con agua, se cierran los Eppendorf y ya se pueden analizar, o congelar (Vashishtha *et al.*, 2013).



Fotografías 12 y 13: Lugar de trabajo para realizar la exudación. Se pueden ver las dos gradillas con los Eppendorf que contiene el EDTA y el agua con los dos patrones internos. Además, se pueden ver las dos placas petri con el EDTA y el agua, junto con la cuchilla para realizar los cortes. Las fiambreras hacen la función de la cámara húmeda.



Fotografías 14 y 15: En la imagen de la izquierda se ve una cámara húmeda con el Eppendorf preparado para pasar las hojas coartadas al EDTA. En la fotografía contigua, se muestra una hoja a la que se le ha retirado ya las clip cages. Se puede apreciar como el número de pulgones se ha incrementado mucho. Corresponde a una hoja de una muestra con pulgón de 96 horas.



Fotografías 16 y 17: En la fotografía de la izquierda se presenta la zona de trabajo; donde se puede ver una de las tres plantas que conforman cada replica a la que se le acaba de cortar las dos hojas. En la tapa de la placa petri se encuentran las hojas antes de ser cortadas y pasada a la placa. En la imagen de la derecha se muestra las seis hojas en el Eppendorf con EDTA.



Fotografías 18 y 19: En estas fotografías se puede ver las cámaras húmedas que contienen los Eppendorfs con las hojas, y cómo se logra la oscuridad con una bolsa de basura.



Fotografía 20: Se puede ver cómo quedan las cámaras húmedas realizando el proceso de exudación.



Fotografías 21 y 22: Se puede observar el proceso de lavado del EDTA en la placa petri con agua, y como se fueron pasando las hojas al Eppendorf con agua.

3.5 Análisis de carbohidratos

El análisis de carbohidratos se realizó por el método de cromatografía de intercambio aniónico con detección amperométrica, utilizando un equipo AnCat 850 Professional IC-Advanced Bioscan 871. La separación de los azúcares se realizó en una columna RCX-30 (Hamilton) de 250 x 46 mm y 7 μm de tamaño de partícula, empleando NaOH 150 mM como fase móvil a una temperatura de 32°C y un flujo de 1 ml/min constantes (Vashishtha *et al.*, 2013). Los resultados se obtuvieron por medio del software MagIC Net. Estos análisis se llevaron a cabo en los Servicios Técnicos de Investigación de la UA. Los patrones que se hicieron fueron: sacarosa (10 a 80 $\mu\text{g/mL}$); glucosa, fructosa e inositol (2 a 10 $\mu\text{g/mL}$) y sorbitol (0,2 a 1 $\mu\text{g/mL}$), en todos los rangos se representaron con 5 puntos para la recta.

Los análisis se hicieron con el programa estadístico SPSS, mediante un test de la t de variables independientes, para comparar los dos grupos del mismo tiempo de tratamiento. Pero para poder asumir que son variables independientes, se emplea el test de Levene. En el caso del ensayo, se podría realizar un MANOVA para comparar entre los tratamientos. Además, para la realización de las distintas tablas e histogramas se hizo con el programa Microsoft Excel 2010.



Fotografías 23 y 24: Preparación de las muestras de la exudación para el análisis de los carbohidratos. Se muestra como se recogió todo el volumen con la jeringuilla y después se pasó a los tubos de ensayo a través de un filtro.

3.6 Análisis de aminoácidos

De la muestra de la exudación del floema se destina una cantidad de volumen para la cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas UHPLC-MS/MS (Harder *et al.*, 2011). Los patrones se prepararon de los 21 aminoácidos a estudiar más la cistina como patrón interno. De cada uno de ellos se pesaron 2 mg excepto del patrón interno que se pesó 1mg, y se depositaron cada uno de ellos en Eppendorfs distintos. A los Eppendorfs se les añadió 1 mL de agua ultrapura. Los aminoácidos Glu, Asp y Tyr, al costar más de disolver se hicieron en disoluciones aparte, a las cuales se le añadieron 20 mL de agua ultrapura. Se disolvieron con un vórtex y en el caso de los 3 aminoácidos mencionados, con un agitador magnético. Las rectas patrones se hicieron en agua, y con concentraciones que iban desde 0,25 hasta 10 ppm ($\mu\text{g/mL}$) (Harder *et al.*, 2011).

La separación y el análisis de los aminoácidos libres se realizó mediante UHPLC-MS/MS. El equipo empleado un sistema Agilent 1290 Infinity UHPLC, unido a un espectrómetro de masas Agilent 6490 de triple cuadrupolo con un Agilent Jet Stream recurso iónico en modo de ionización positiva. La separación fue llevada a cabo en una columna Agilent Zorbax Exetend-C18, la cual se mantuvo a 25 °C durante todo el análisis. La fase móvil consiste en un disolvente A (0,05% de ácido fórmico y 0,03% de ácido heptafluorobutirico (HFBA) en agua), y otro disolvente B (0,05% de ácido fórmico y 0,03% de HFBA en acetonitrilo), usando el gradiente mostrado en la tabla 1.

Tabla 1: Gradiente empleado para la separación de los compuestos en la cromatografía líquida. Se muestra el tiempo y el porcentaje de ambos disolventes en cada uno de los distintos tiempos.

Tiempo (min)	Disolvente A (%)	Disolvente B (%)	Temperatura (°C)	Flujo (mL/min)
0,0	100	0	25	0,4
2,5	100	0	25	0,4
5,5	60	40	25	0,4
5,6	10	90	25	0,4
6,0	10	90	25	0,4

La técnica de UHPLC-MS/MS es un método dirigido con el que se cuenta con información previa de lo que se quiere buscar, sabiendo el ion precursor, la energía con su determinado voltaje para fragmentarlo y dar lugar a los iones productos. El hecho de que sea dirigida, hace que aumente de forma considerable la sensibilidad, ya que el equipo puede dedicar más tiempo a los compuestos que realmente interesan. El proceso que comprende desde el ion precursor hasta los iones productos, se denomina transición. El ion precursor es el nombre que recibe el aminoácido de interés (porque es dirigido) con un ion, en este caso, al ser una ionización positiva, se le incorpora un H^+ . Como es de esperar, cada ion precursor se fragmenta a una energía de colisión independientemente de los demás compuestos. Una vez se rompe, da lugar a varios fragmentos, también llamados masas, en este caso se han escogido las dos masas más abundantes, pero teniendo en cuenta que las masas moleculares de los fragmentos, no coincidan entre los iones productos de los otros iones precursores. Ya que si son del mismo peso, la maquina no puede discernir si se trata un compuesto u otro. Por lo tanto, el equipo cuantifica con el ion precursor más mayoritario y la otra masa, la emplea como cualificadora, para asegurarse de que es el compuesto correspondiente. Este procedimiento se lleva a cabo en primer lugar por una cromatografía (UHPLC), en la cual se realiza el pinchazo de la muestra, y va a separar los compuesto de interés de los otros con una resolución de 0,7 Da (unit). La muestra en estado líquido, pasa por la fuente para realizar una ionización por electrospray, es decir se aplica temperatura para pasar a estado gaseoso y se ioniza con el H^+ . Ahora pasa al primer cuadrupolo donde se seleccionan los iones. Una vez seleccionados pasan al segundo cuadrupolo, el cual consiste en una cámara de colisión, donde a cada ion precursor se le aplica su energía necesaria para fragmentarse. Por último, en el tercer cuadrupolo solo deja pasar al detector los iones productos.

La diferencia entre una cromatografía UHPLC de una HPLC, es que la UHPLC es mucho más rápida, tiene más presión y reduce el tiempo. Los gradientes son más cortos, más estrechos por lo que se incrementa la resolución (Florencio-Ortiz *et al.*, 2018)

Las transiciones específicas MRM (Multiple Reaction Monitoring) utilizadas para la cuantificación de cada aminoácido así como los parámetros optimizados se resumen en las tablas 1 y 2.

Se analizaron un total de 21 aminoácidos, además de la cistina, como patrón interno.

Se emplearon dos programas para poder cuantificar los aminoácidos de interés. El primero de ellos el MassHunter Workstation (version B.07.01) para la adquisición de datos, en la cual se muestra una tabla con todos los aminoácidos, mostrando su tiempo de retención, la concentración final entre otros. Y el segundo programa es el MassHunter Qualitative Analysis la versión (B.07.00), and Quantitative Analysis. Se eligieron las dos transiciones más abundantes de cada uno de los aminoácidos, teniendo presente que no coincidiera ninguna masa molecular de los iones productos. La cuantificación se hace acorde al nivel interno de cistina.

Los análisis de los aminoácidos también se hicieron con los programas SPSS y Microsoft Excel 2010, siguiendo las mismas pautas que en los carbohidratos.

Tabla 2: Recopilación del tiempo de retención, el peso molecular de los iones precursores, los respectivos iones productos mayoritarios y su respectiva energía de colisión para lograr fragmentarlos, de todos los aminoácidos a estudiar.

Aminoácido	T. Ret (min)	Ion precursor (m/z)	Ion producto (m/z)	CE (V)
Alanina	0,521	90,09	44,05	10
			42,00	10
Arginina	1,538	175,20	70,00	16
			60,06	25
Asparagina	0,424	133,10	87,10	4
			74,10	10
Aspartato	0,442	134,10	88,00	5
			74,00	10
Cisteína	0,509	122,00	76,00	25
			59,00	25
Cistina	0,484	241,00	151,90	4
			195,00	4
Glicina	0,447	76,07	51,70	4
			29,90	30
Glutamato	0,800	148,10	130,10	4
			84,10	15
Glutamina	0,450	147,10	130,10	15
			84,10	5

Hidroxiprolina	0,434	132,00	85,90 68,00	4 4
Histidina	0,822	156,10	109,90 93,04	25 25
Isoleucina	4,224	132,20	69,10 56,90	4 20
Leucina	4,289	132,20	86,10 54,90	4 20
Lisina	0,900	146,90	130,08 83,90	25 25
Metionina	2,500	150,20	104,05 56,05	25 25
Fenilalanina	4,500	166,20	119,90 103,06	25 25
Prolina	0,641	116,10	70,00 68,05	25 25
Serina	0,436	106,10	88,04 60,05	15 25
Treonina	0,491	120,10	74,01 56,01	20 20
Triptófano	4,843	205,20	188,00 146,00	4 16
Tirosina	4,089	182,00	136,00 91,00	10 20
Valina	2,110	118,10	72,00 55,06	25 25



Fotografía 25: El equipo de UHPLC-MS/MS de los Servicios Técnicos de Investigación de la UA empleado para los análisis de aminoácidos.



Fotografías 26 y 27: Son dos placas especiales para la cromatografía. La placa de la izquierda se corresponde a las muestras de la prueba, donde en la primera fila se encuentran los patrones y el blanco, y en la fila posterior los C, CC y P. En la placa de la derecha se muestra la placa correspondiente de los análisis del ensayo, en la cual en la primera fila también se encontraban el blanco y los patrones, y los diferentes tratamientos, 96, 3, 48 y 24 horas por ese orden. En la imagen se puede ver como solo están puestas las muestras de 96 y 3 horas, el motivo es que la exudación de los otros tratamientos se realizaban mientras se analizaban los de 96 y 3 horas, y después se incorporarían al equipo.

4. Resultados

Los experimentos de la prueba y el ensayo tiene pequeños matices entre ellos y entre la metodología ya explicada.

4.1 Prueba

Este experimento se hizo con plantas que se sembraron el día 6 de febrero. Como he mencionado antes en esta prueba solo se realizó el tratamiento de 96 horas. Según la metodología explicada en el anterior apartado, se definió de la siguiente manera:

El día de la exudación, se prepararon las disoluciones de EDTA 20 mM, el KOH a 6N, y en agua ultrapura. Se pusieron 1,5 mL de agua o de EDTA en los Eppendorfs. Se prepararon 12 de cada solución, 4 de cada uno de los tres grupos. En el invernadero, de las 12 plantas de cada grupo, se separaron al azar en 4, de modo que cada replica consta de 3 plantas, que hacen un total de 6 hojas. Se paró el tratamiento y se procedió a cortar las hojas tratadas con una cuchilla. Se cortaron en la tapa de una placa petri con EDTA 20 mM y se reservaron en la propia placa con EDTA, y se fueron colocando en los Eppendorf las 6 hojas que conforman cada replica. El tiempo que se dejó con el tratamiento del EDTA, fue de 90 minutos en la cámara húmeda. Transcurridos el tiempo, se lavaron los tallos y se colocaron en los Eppendorf

que contenían el 1,5 mL de agua. Se colocaron de nuevo en las cámaras húmedas durante 3 horas. Una vez pasadas las 3 horas en el agua, se guardaron los Eppendorf y se desecharon las hojas. De cada muestra se homogenizó con el vórtex y se depositaron 450 μ L de la muestra en otro Eppendorf nuevo, al cual se le añadieron 50 de cistina 2 a ppm. Estos Eppendorf se apartaron para el análisis de aminoácidos.

4.1.1 Aminoácidos libres

Durante el tiempo de espera se prepararon los patrones de los aminoácidos a concentraciones de 0,25; 0,5; 1; 2; 5 y 10 ppm. Los patrones se hicieron con agua ultrapura, con una disolución madre que contenía 18 aminoácidos, los tres aminoácidos hechos aparte por su baja solubilidad (Glu, Asp y Tyr) y cistina a una concentración constante de 2 ppm, como patrón interno.

Para medir los aminoácidos libres, se colocaron en una placa especial para el equipo de UHPL-MS/MS. En cada uno de los pocillos se vertieron 100 μ L. En este caso, debido a que la cistina se añadió después de realizar la exudación y, por tanto no cumplía su papel como patrón interno, por eso, en el programa de MassHunter Workstation donde aparecen todos los compuestos que se quieren cuantificar, se marcó una opción para omitir el patrón interno (Cis).

Con el programa MassHunter Qualitative Analysis and Quantitative Analysis, se obtuvieron las rectas patrones de todos los aminoácidos a partir de las concentraciones de 0,25 a 10 ppm, (ver Anexo, apartado 8.1.1 pág 57.).

Además, se obtuvieron los cromatogramas de los patrones y de todas las muestras, a continuación, se muestra un ejemplo de cada uno de los grupos (patrones, C, CC y P).

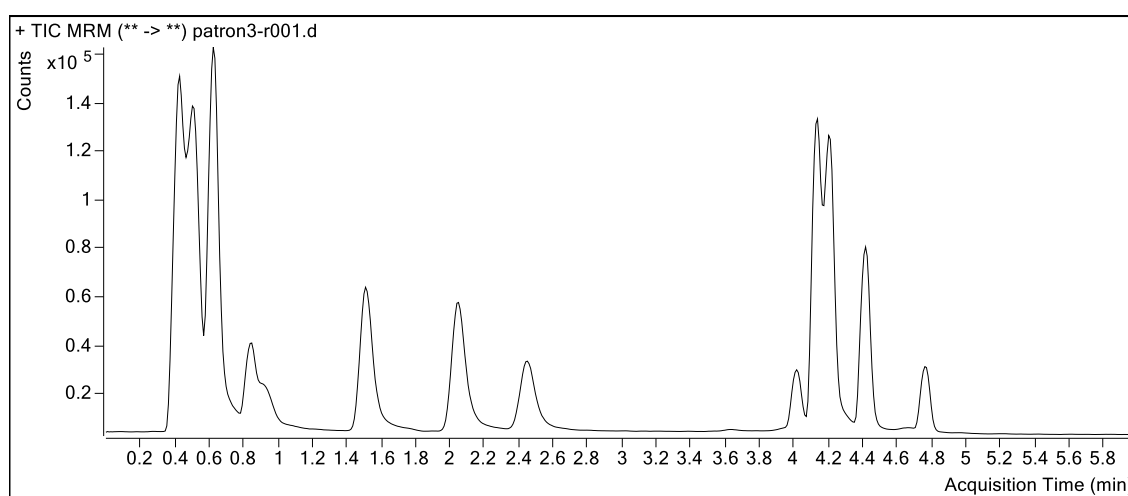


Figura 3: Cromatografía líquida realizada para la separación de la mezcla patrón de aminoácidos a 2 ppm.

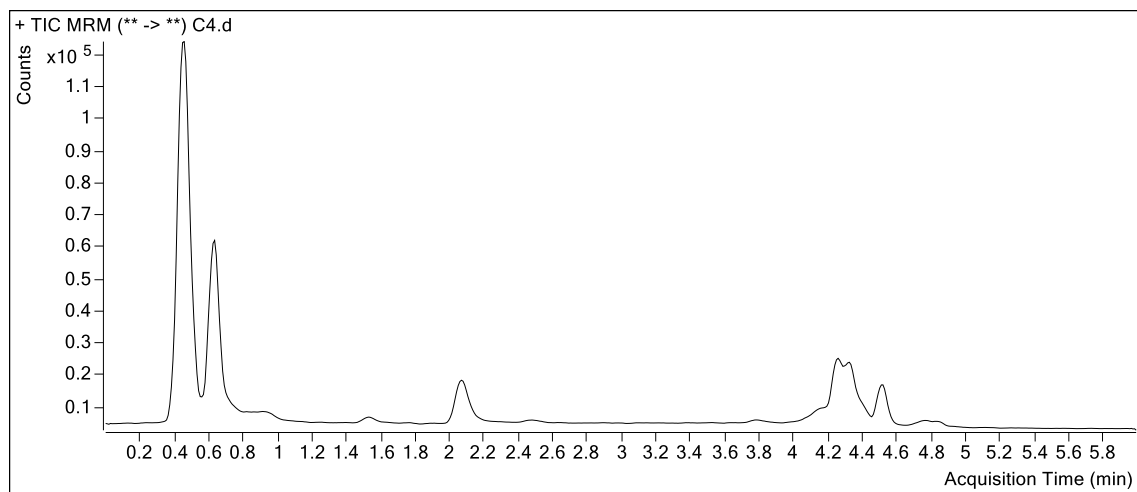


Figura 4: Ejemplo de la separación de los compuestos en la muestra del Control C4.

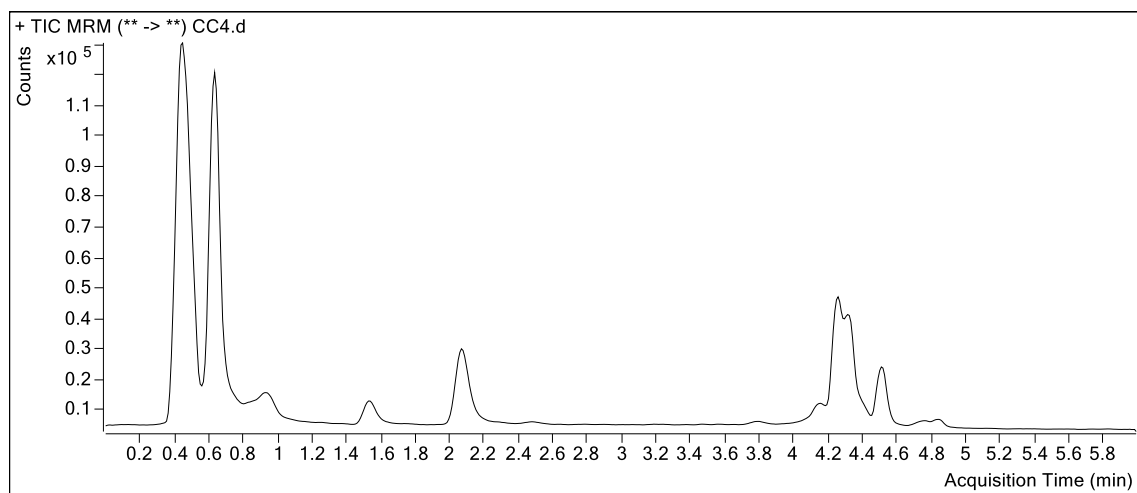


Figura 5: Ejemplo de un Cromatograma para la muestra del Control Clip Cages CC4.

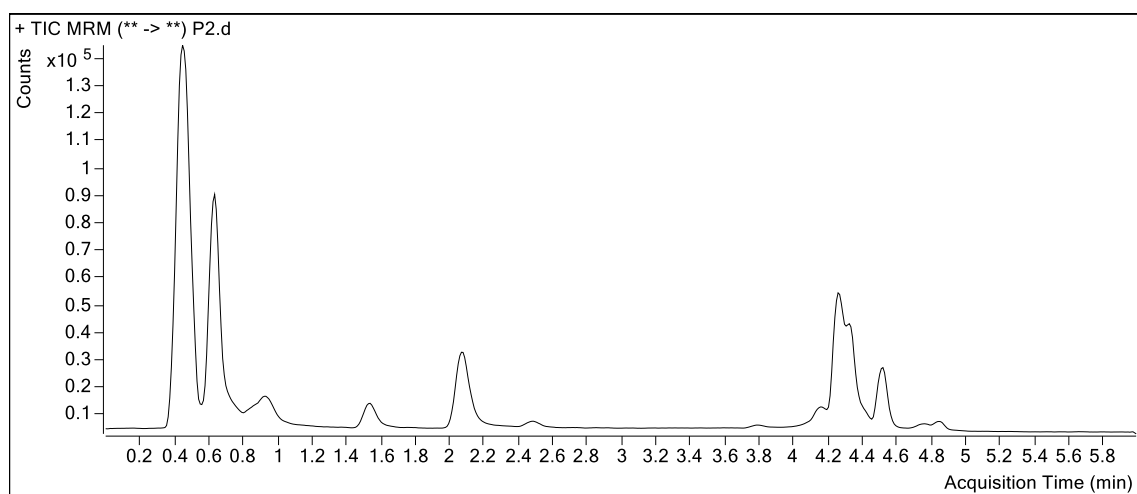


Figura 6: Representación de la separación mediante cromatografía de los aminoácidos de la muestra del Pulgón 2.

Con el programa Excel se calcularon las medias y la desviación estándar (ver Anexo apartado 8.1.2, pág 62, tabla 8). Con las medias y las desviaciones estándares realicé dos histogramas. En el primero de ellos (figura 7), se comparan los grupos de los controles y los controles sin clip cages, esto lo hice para cerciorarme de que era necesario poner las clip cages a los controles también a la hora de la realización del ensayo final, ya que en el caso de que los resultados no fueran significativos, se emplearían la mitad de trampas y la metodología sería más rápida.

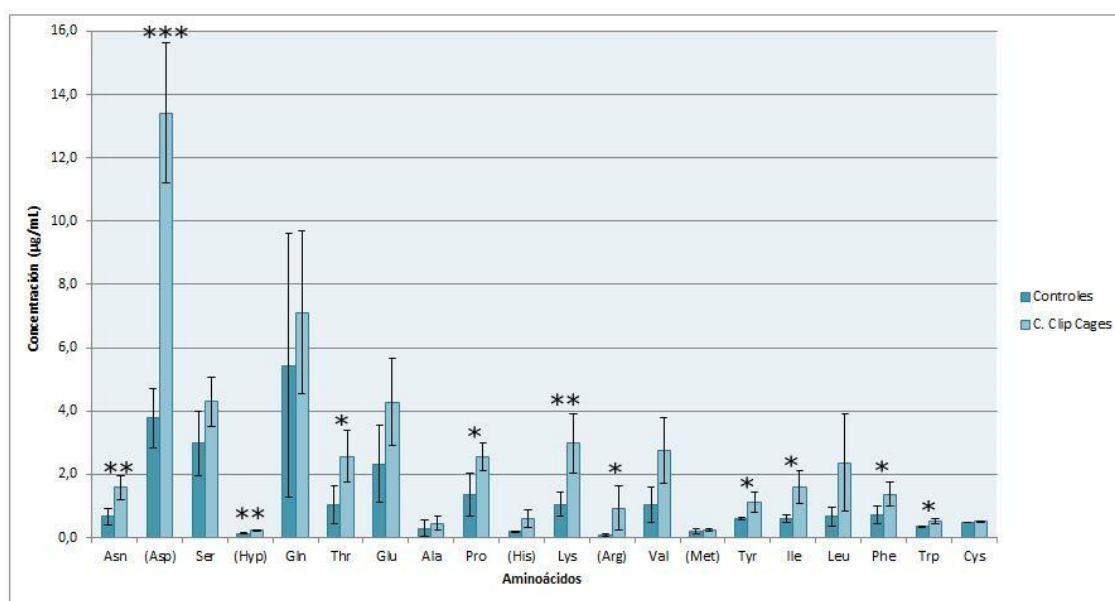


Figura 7: Representación de todos los aminoácidos, menos la glicina que no se detectó en las muestras, de las réplicas del control y las del control con clip cages. Cada barra es la media de las concentraciones del grupo. Además, se muestra su respectivo error estándar. Por medio de un código, se marcan los resultados significativos, siendo “***” una p. valor < 0,001; “**” una p. valor de 0,01 > p > 0,001; y “*” una p. valor de 0,05 > p > 0,01. Los aminoácidos entre los paréntesis, indican que sus medias, no entran dentro de la recta patrón correspondiente, por lo que sus resultados estadísticos no son del todo seguros. Los valores tanto de las medias como de las p. valores se encuentran en los anexos, (Anexo apartado 8.1.3, pág 66, tabla 10).

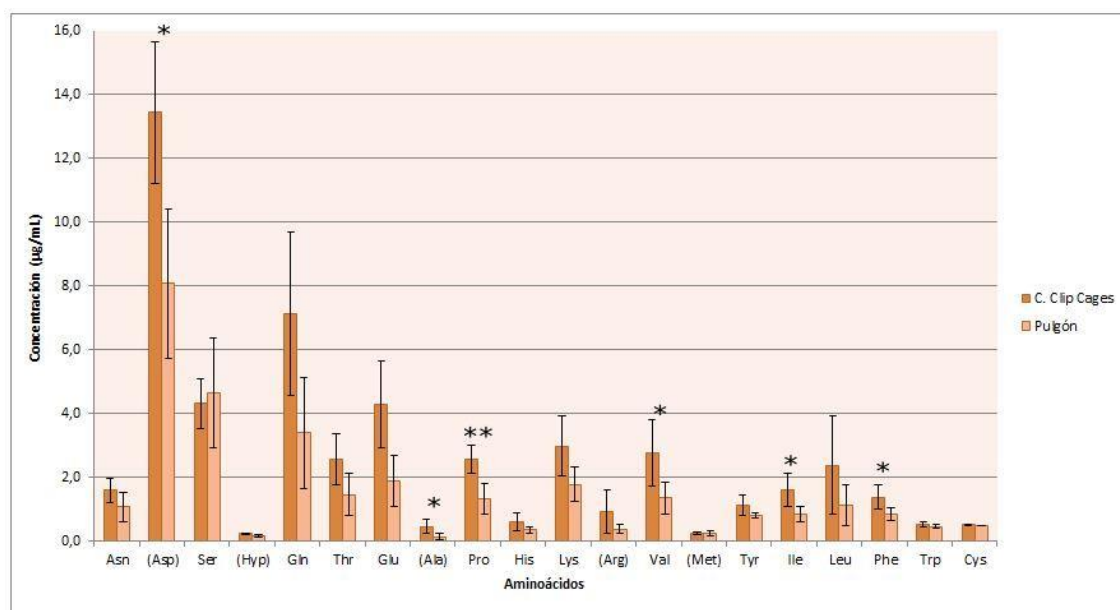


Figura 8: Representación de las concentraciones medias de los aminoácidos excepto de la glicina, de las réplicas controles con las clip cages y los pulgones. También viene dado el error estándar. Por medio de un código, se marcan los resultados significativos, siendo “***” una p. valor de $0,01 > p > 0,001$; y “**” una p. valor de $0,05 > p > 0,01$. Los aminoácidos entre los paréntesis, indican que sus medias, no entran dentro de la recta patrón correspondiente, por lo que sus resultados estadísticos no son del todo seguros. Los valores tanto de las medias como de las p. valores se encuentran en los anexos (ver Anexo, apartado 8.1.3, pág 69, tabla 12).

Puesto que en la figura 7, sí que hay muestras significativas en varios aminoácidos, es preciso que los controles del ensayo lleven las trampas.

4.1.2 Carbohidratos

Se prepararon los patrones con cuatro azúcares, glucosa, sacarosa, fructosa y trehalosa. Se pesaron 20 mg de cada uno de ellos y se disolvieron en 20 mL de agua ultrapura.

Para analizar las muestras, se empleó la muestra restante Además, como se ha explicado en la introducción, los azúcares, están a mayor concentración que los aminoácidos, por ello se prepararon dos diluciones de cada muestra una 1:5, y otra 1:10. La muestra inicial se filtró, ya que es uno de los requisitos del equipo a usar, en un tubo de ensayo. Para ello, se usó una jeringuilla y un filtro con un diámetro de poro de $0,45 \mu\text{m}$, y un diámetro de 25 mm. El problema fue que el filtro empleado, absorbió gran parte de la primera muestra, el control 1 (C1). Por lo que a partir de ese momento se humedeció previamente el filtro. Y partir de la muestra filtrada, se realizaron las disoluciones. Como esta prueba, era para familiarizarse con la metodología y detectar posibles fallos, en el caso de los azúcares, no se analizaron todas las muestras, solamente C1 y P1.

4.2 Ensayo final

En este caso se hizo el ensayo en cuatro días. Los tratamientos a realizar fueron de 4 tiempos de infestación distintos, 96, 48, 24 y 3 horas. De cada uno de los tratamientos se hicieron dos subgrupos: controles (dos hojas también con una clip cage vacía) e infestadas con pulgones. De cada uno de los subgrupos, se separaron a su vez 13 plantas del mismo tamaño aproximadamente. Los individuos del ensayo final se dividieron igual que en la prueba. De cada subgrupo se dividieron en cuatro agrupaciones al azar de 3 individuos cada uno. Se escogió una planta para realizar el tratamiento por si al quitar las clip cages, se rasgaban las hojas. De esta manera se analizaron 96 plantas, pero realizando el tratamiento eran 104.

Tabla 3: Cronograma de las diferentes tareas que se realizaron para los cuatro tratamientos, marcando el inicio y la duración de cada una.

		Viernes 13/04	Sábado 14/04	Domingo 15/04	Lunes 16/04	Martes 17/04	Miércoles 18/04
96	Infestación						
	Exudación						
48	Infestación						
	Exudación						
24	Infestación						
	Exudación						
3	Infestación						
	Exudación						

En el primer día se efectuó la infestación del tratamiento de 96 horas.

El segundo día de trabajo, se realizó la infestación de 48 horas y se prepararon de nuevo los patrones.

El tercer día se realizó la infestación de 3 y 24 horas. Además, también se efectuó la exudación del tratamiento de 3 y 96 horas. El procedimiento de trabajo para la exudación fue el mismo. Sin embargo, en el paso de dejar los tallos en agua, se modificó ligeramente ya que en este caso, el volumen de agua que se vertió en los Eppendorfs, fue de 1 mL, con el fin de poder concentrar un poco más la muestra. Además, las hojas estuvieron 4 horas incorporadas en el agua. En el agua se añadió cistina a 2 ppm y lactosa a 8 ppm para que actuaran de patrón interno para el análisis de los aminoácidos y carbohidratos respectivamente. El motivo de poner la lactosa a 8 ppm es para que al realizar las diluciones de las muestras (1:4), la concentración final sea de 2 ppm. El motivo de incorporar los patrones internos es para asegurarse o poder detectar si ha ocurrido algún problema con la exudación, ya que de estos compuestos, sí que se conoce la concentración a la que deben estar a la hora de realizar los análisis.

Al terminar las exudaciones de 3 y 96 horas, se observó en tres muestras que alguno de los peciolos no quedó sumergido por el agua durante toda la exudación. Esto ocurrió porque en el momento de incorporarlos, sí que quedaron sumergidos completamente, pero al poner solo 1 mL, en vez de 1,5 mL, y que se pierde un poco de volumen, el nivel del agua del Eppendorf

bajó, y algunos peciolo quedaron por encima. En dos muestras, solo ocurrió que un único peciolo, no estaba en contacto con el agua (96h Control 1 y 96 Control 3). Sin embargo en otra, fueron 3 hojas las que quedaron por encima (3h Control 2)

El último día se realizó la exudación de los tratamientos de 24 y 48 horas. En estos casos, se volvió a poner los dos patrones internos (lactosa y cistina) y se dejaron también 4 horas. No obstante, se puso de nuevo 1,5 mL en los Eppendorfs. Esta vez, no hubo el problema de que los peciolo no quedasen sumergidos durante toda la exudación. Aunque se vio, que el volumen de agua restante era muy bajo en (inferior a 1 mL en casi todas las muestras)(ver tabla 6).

4.2.1 Aminoácidos libres

En el análisis de los aminoácidos se empleó el mismo equipo que en la prueba. Se hicieron los patrones de la misma manera y a las mismas concentraciones. En la placa para realizar el análisis se puso el blanco (acetonitrilo), los patrones y todas las muestras de todos los tratamientos. En cada pocillo se vertió 100 μ L, excepto de la muestra que mostró niveles muy bajos de volumen, por lo que solo se incorporó 50 μ L de esta.

Al realizar el análisis en el equipo, no se vieron resultados fiables, ya que los niveles de cistina (el patrón interno), fueron muy distintos entre todas las muestras. Además, las concentraciones obtenidas, no estaban acorde con los resultados obtenidos en la prueba, puesto que las concentraciones eran demasiado bajas y no llegan al mínimo para incluirlas en la recta patrón. Consecuentemente, solo se podía hacer estadística de unos 4 aminoácidos y con resultados muy poco fiables, por ese motivo no he realizado la parte estadística correspondiente. A continuación se muestra una tabla (ver tabla 4) con los resultados en bruto, donde se puede ver la concentración de cistina (que debería estar a 2 ppm) y el resto de aminoácidos en cada una de las muestras.

Tabla 4: Resultados obtenidos de las concentraciones de los aminoácidos de cada una de las muestras, incluyendo el patrón interno (Cis), y las concentraciones de los patrones. Las letras "N.D." indican que no se detectó la presencia de los aminoácidos en las muestras correspondientes y en las condiciones aplicadas.

Muestra	Concentración final (µg/mL)										
	Cis	Asn	Ser	Asp	Gly	Gln	Lys	Thr	Cys	Ala	Glu
patron5-10	31408,08	5,012	4,002	4,397	4,820	6,393	6,011	5,264	3,954	5,069	5,423
patron4_5	20105,24	4,982	4,941	4,913	4,887	4,991	5,007	4,979	4,977	4,966	5,042
patron3-2	21325,10	2,092	2,213	2,257	2,393	2,080	2,031	2,110	2,275	2,154	1,909
patron2-1	31776,32	0,899	0,908	0,951	0,838	0,877	0,882	0,867	0,504	0,848	0,915
patron1-0.5	29869,54	0,495	0,414	0,505	0,382	0,491	0,508	0,521	0,497	0,517	0,597
patron0_0.25	25067,38	0,282	0,274	0,124	0,613	0,312	0,323	0,273	0,496	0,265	0,287
96hP4	2167,56	0,075	N.D.	N.D.	N.D.	0,103	0,254	0,080	0,496	0,108	0,226
96hP3	12135,75	0,001	N.D.	N.D.	N.D.	0,066	0,101	0,068	0,497	0,098	0,161
96hP2	5699,24	0,007	N.D.	N.D.	N.D.	0,065	0,156	0,072	0,495	0,102	0,191
96hP1	482,74	0,265	0,109	N.D.	N.D.	0,147	1,426	0,121	0,508	0,183	0,732
96hC4	10822,53	0,002	N.D.	N.D.	N.D.	0,061	0,102	0,070	0,498	0,098	0,163
96hC3	8582,82	0,006	N.D.	N.D.	N.D.	0,064	0,148	0,070	0,497	0,099	0,175
96hC2	7404,67	0,001	N.D.	N.D.	N.D.	0,064	0,136	0,070	0,497	0,099	0,176
96hC1	1303,52	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,089	0,449	0,087	0,497	0,106	0,261
48hP4	39861,64	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,089	0,115	0,100	0,745	0,146	0,229
48hP3	33023,14	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,089	0,118	0,102	0,745	0,149	0,230
48hP2	1562,34	0,025	N.D.	N.D.	N.D.	0,096	0,126	0,115	0,753	0,174	0,243
48hP1	1054,57	0,018	N.D.	N.D.	N.D.	0,106	0,126	0,138	0,744	0,227	0,285
48hC4	30054,51	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,090	0,126	0,101	0,745	0,147	0,235
48hC3	1011,53	0,005	N.D.	N.D.	N.D.	0,105	0,127	0,160	0,755	0,196	0,303
48hC2	1184,97	0,027	N.D.	N.D.	N.D.	0,099	0,140	0,124	0,746	0,234	0,423
48hC1	31413,00	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,090	0,121	0,101	0,745	0,147	0,232
3hP4	12267,88	0,013	N.D.	N.D.	N.D.	0,062	0,092	0,069	0,497	0,099	0,158
3hP3	5917,21	0,024	N.D.	N.D.	N.D.	0,065	0,122	0,074	0,495	0,105	0,177
3hP2	11243,73	0,004	N.D.	N.D.	N.D.	0,061	0,101	0,070	0,497	0,100	0,162
3hP1	9638,86	0,005	N.D.	N.D.	N.D.	0,062	0,108	0,070	0,495	0,101	0,164
3hC4	8973,28	0,012	N.D.	N.D.	N.D.	0,063	0,108	0,070	0,497	0,102	0,164
3hC3	2664,31	0,041	N.D.	N.D.	N.D.	0,074	0,221	0,083	0,500	0,118	0,229
3hC2	10755,02	0,008	N.D.	N.D.	N.D.	0,062	0,100	0,069	0,496	0,100	0,161
3hC1	5,63	29,727	36,387	16,207	14,371	8,215	35,621	3,095	0,914	4,560	16,349
24hP4	31765,40	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,090	0,119	0,100	0,742	0,149	0,231
24hP3	25645,77	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,091	0,137	0,102	0,742	0,147	0,238
24hP2	35076,75	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,090	0,123	0,103	0,746	0,146	0,232
24hP1	2887,72	0,019	N.D.	N.D.	0,016	0,102	0,129	0,125	0,749	0,170	0,391
24hC4	2614,97	0,002	N.D.	0,378	N.D.	0,093	0,113	0,112	0,746	0,231	0,498
24hC3	1657,72	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,106	0,131	0,129	0,756	0,158	0,301
24hC2	48021,51	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,089	0,112	0,101	0,746	0,145	0,228
24hC1	1526,40	0,002	N.D.	N.D.	N.D.	0,089	0,122	0,115	0,751	0,169	0,302

Tabla 5: Continuación de la tabla anterior con los aminoácidos restantes.

Muestra	Concentración final (µg/mL)										
	Pro	His	Arg	Val	Met	Tyr	Ile	Hyp	Leu	Phe	Trp
patron5-10	5,942	7,445	6,579	6,578	6,851	7,837	7,087	6,870	6,719	7,826	7,575
patron4_5	5,014	5,080	5,052	5,063	5,060	5,090	5,035	5,023	5,045	5,061	5,109
patron3-2	2,016	1,856	1,909	1,865	1,886	1,819	1,970	1,991	1,939	1,879	1,743
patron2-1	0,875	0,813	0,875	0,903	0,871	0,825	0,843	0,876	0,847	0,883	0,888
patron1-0.5	0,495	0,549	0,530	0,545	0,536	0,580	0,508	0,508	0,538	0,537	0,565
patron0_0.25	0,350	0,452	0,384	0,374	0,397	0,436	0,394	0,353	0,382	0,390	0,445
96hP4	0,090	0,313	0,232	0,142	0,177	0,342	0,149	0,239	0,285	0,277	0,293
96hP3	0,089	0,308	0,213	0,134	0,174	0,237	0,126	0,139	0,177	0,184	0,264
96hP2	0,089	0,310	0,206	0,133	0,175	0,261	0,152	0,163	0,202	0,201	0,270
96hP1	0,163	0,337	0,342	0,170	0,196	0,842	0,355	0,677	0,688	0,749	0,398
96hC4	0,089	0,308	0,202	0,133	0,175	0,247	0,131	0,142	0,180	0,189	0,263
96hC3	0,089	0,309	0,201	0,133	0,175	0,246	0,149	0,151	0,185	0,194	0,265
96hC2	0,090	0,309	0,203	0,133	0,174	0,256	0,145	0,153	0,195	0,196	0,266
96hC1	0,092	0,310	0,200	0,143	0,176	0,304	0,148	0,162	0,191	0,338	0,419
48hP4	0,132	0,461	0,299	0,199	0,261	0,348	0,195	0,192	0,251	0,265	0,393
48hP3	0,132	0,461	0,300	0,199	0,261	0,352	0,188	0,194	0,253	0,267	0,393
48hP2	0,154	0,470	0,316	0,218	0,264	0,655	0,513	0,570	0,633	0,602	0,476
48hP1	0,164	0,475	0,312	0,239	0,267	0,889	0,645	0,760	0,761	0,727	0,548
48hC4	0,132	0,462	0,299	0,199	0,261	0,356	0,186	0,197	0,255	0,266	0,393
48hC3	0,159	0,475	0,315	0,229	0,266	0,797	0,189	0,819	0,826	0,737	0,472
48hC2	0,150	0,468	0,321	0,247	0,265	0,763	0,349	0,713	0,779	0,644	0,476
48hC1	0,132	0,461	0,300	0,199	0,261	0,353	0,191	0,197	0,255	0,267	0,393
3hP4	0,088	0,308	0,202	0,132	0,174	0,240	0,128	0,143	0,179	0,187	0,262
3hP3	0,091	0,311	0,203	0,136	0,175	0,254	0,155	0,167	0,203	0,205	0,271
3hP2	0,090	0,308	0,204	0,135	0,175	0,247	0,139	0,144	0,183	0,190	0,268
3hP1	0,089	0,308	0,201	0,134	0,174	0,252	0,123	0,145	0,186	0,190	0,264
3hC4	0,089	0,309	0,203	0,134	0,174	0,248	0,138	0,149	0,189	0,189	0,265
3hC3	0,097	0,311	0,219	0,140	0,177	0,316	0,202	0,222	0,266	0,249	0,285
3hC2	0,089	0,309	0,202	0,133	0,175	0,246	0,138	0,142	0,180	0,188	0,265
3hC1	19,511	2,887	7,406	2,998	2,599	42,642	50,325	46,331	46,108	37,676	14,386
24hP4	0,133	0,462	0,299	0,199	0,261	0,351	0,189	0,195	0,256	0,268	0,395
24hP3	0,132	0,461	0,300	0,199	0,262	0,356	0,181	0,202	0,258	0,271	0,394
24hP2	0,133	0,462	0,301	0,203	0,263	0,352	0,191	0,196	0,256	0,268	0,394
24hP1	0,145	0,471	0,318	0,252	0,289	0,528	0,222	0,449	0,487	0,439	0,423
24hC4	0,145	0,472	0,305	0,257	0,264	0,503	0,409	0,395	0,463	0,450	0,425
24hC3	0,145	0,466	0,313	0,213	0,268	0,648	0,444	0,534	0,563	0,554	0,468
24hC2	0,132	0,461	0,299	0,198	0,261	0,345	0,185	0,188	0,247	0,263	0,392
24hC1	0,142	0,474	0,306	0,232	0,269	0,680	0,475	0,604	0,587	0,569	0,496

Tabla 6: Tabla del área de la cistina y los volúmenes de los Eppendorf de todas las muestras y los patrones, indicando los volúmenes iniciales, finales y perdidos.

Muestra	Área	Vol. Inicial (mL)	Vol. Final (mL)	Vol. Perdido (mL)
patron0_0.25,	25067			
patron1-0.5,	29870			
patron2-1,	31776			
patron3-2,	21325			
patron4_5	20105			
patron5-10	31408			
96hC1	146	1000	660	340
96hC2	7405	1000	775	225
96hC3	8583	1000	690	310
96hC4	10823	1000	635	365
96hP1	483	1000	725	275
96hP2	5699	1000	755	245
96hP3	12136	1000	700	300
96hP4	2168	1000	720	280
3hC1	6	1000	750	250
3hC2	10755	1000	710	290
3hC3	2664	1000	780	220
3hC4	8973	1000	840	160
3hP1	9639	1000	805	195
3hP2	11244	1000	645	355
3hP3	5917	1000	775	225
3hP4	12268	1000	725	275
48hC1	20942	1500	1020	480
48hC2	790	1500	1000	500
48hC3	674	1500	975	525
48hC4	20036	1500	920	580
48hP1	703	1500	1000	500
48hP2	1042	1500	920	580
48hP3	22015	1500	885	615
48hP4	26574	1500	980	520
24hC1	1018	1500	835	665
24hC2	32014	1500	605	895
24hC3	1105	1500	930	570
24hC4	1743	1500	945	555
24hP1	1925	1500	1115	385
24hP2	23384	1500	1135	365
24hP3	17097	1500	1065	435

4.1.2 Carbohidratos

El análisis de azúcares fue un poco diferente al anterior. Se empleó el mismo equipo, pero los compuestos para realizar los patrones no eran los mismos. Se hicieron patrones de glucosa, sacarosa, fructosa, mio-inositol, sorbitol y lactosa (patrón interno), y en los Servicios Técnicos de Investigación de la UA, emplearon un patrón de manosa que ya tenían preparado. Puesto que el análisis de carbohidratos no se hizo el mismo día que los aminoácidos, se congelaron las muestras. Por lo que una vez descongeladas, dado la problemática del bajo volumen, se centrifugaron las muestras para medir el volumen aproximado de las muestras, lo cual se hizo con una micropipeta (ver tabla 6). Después, según el volumen, se pasó una cantidad exacta a un nuevo Eppendorf, desde el cual se cogería toda la muestra con la jeringuilla y se pasaría a un tubo de ensayo por medio de un filtro. El filtro empleado esta vez, era de un diámetro menor, de 11 mm, pero con el mismo diámetro de poro, por lo que la pérdida de volumen fue menor.

Como ya se ha dicho, los análisis tanto de azúcares como de aminoácidos se llevan a cabo en los Servicios Técnicos de Investigación de la UA y para su utilización es necesario entrar en turnos con otros usuarios. Por este motivo, solo se pudieron analizar la concentración de los carbohidratos del tratamiento de 96 horas y el de 48.

Tabla 7: Concentraciones finales de los patrones de los azúcares junto a sus tiempos de retención.

Patrones	Mio-Inositol		Glucosa		Galactosa		Fructosa		Lactosa		Sacarosa	
	t. Ret (min)	Conc. (µg/mL)	t. Ret (min)	Conc. (µg/mL)	t. Ret (min)	Conc. (µg/mL)	t. Ret (min)	Conc. (µg/mL)	t. Ret (min)	Conc. (µg/mL)	t. Ret (min)	Conc. (µg/mL)
P5	3,17	1,971	11,45	1,904	11,99	0,121	13,45	1,761	22,30	2,114	26,50	10,154
P4	3,17	4,071	11,44	4,040	11,94	0,272	13,43	3,945	22,31	1,999	26,47	19,916
P3	3,17	5,979	11,44	6,058	11,95	0,669	13,42	6,171	22,27	1,899	26,40	39,848
P2	3,17	7,942	11,44	7,794	11,96	1,263	13,42	8,143	22,26	2,020	26,41	60,018
P1	3,14	10,039	11,45	10,102	11,95	2,584	13,41	9,821	22,31	1,969	26,42	80,064

Con el equipo y el software se obtuvieron los cromatogramas de todas las muestras de los tratamientos de 96 y 48 horas, incluidos los patrones. Se presenta a continuación unos ejemplos del patrón 3 y de un control y un caso con pulgón.

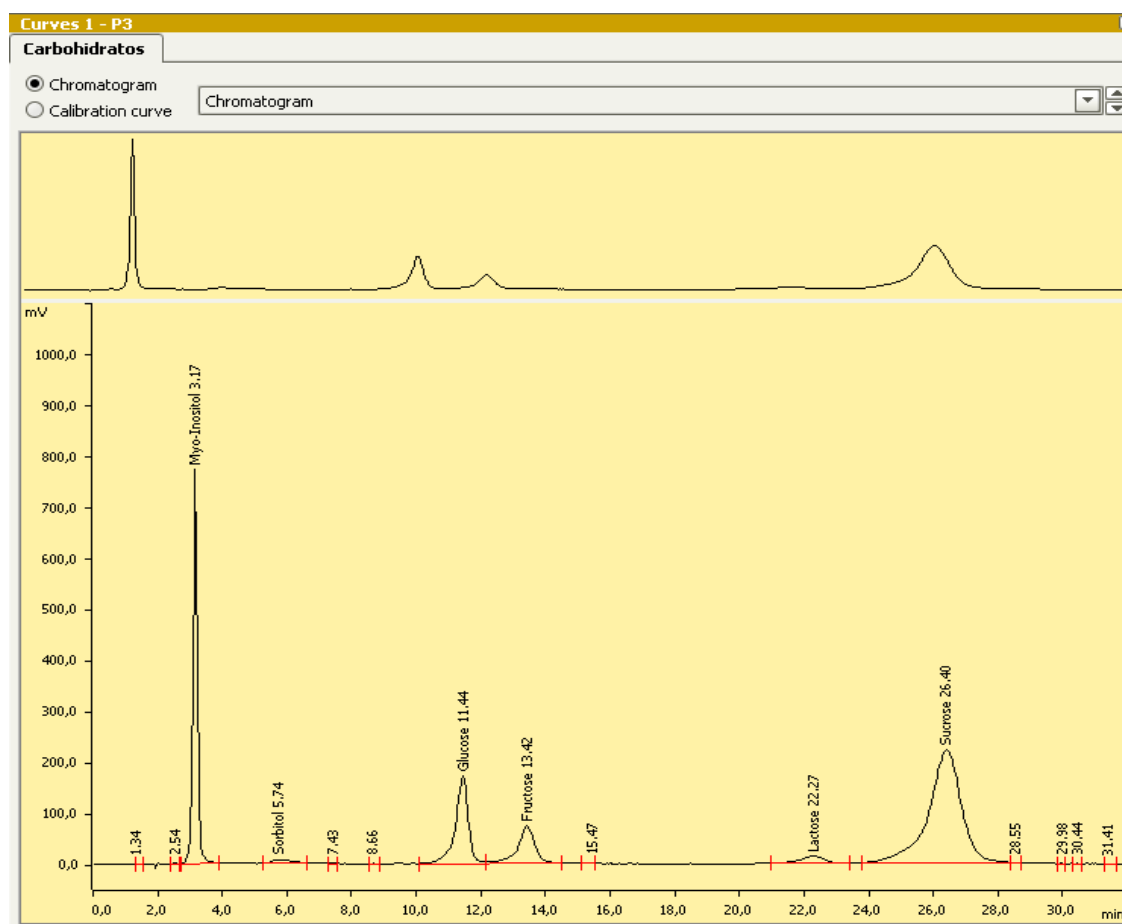


Figura 9: Representación de la separación de los azúcares incorporados en el equipo del patrón 3. Se puede ver la respuesta (eje y) en función del tiempo de retención de cada uno de los carbohidratos.

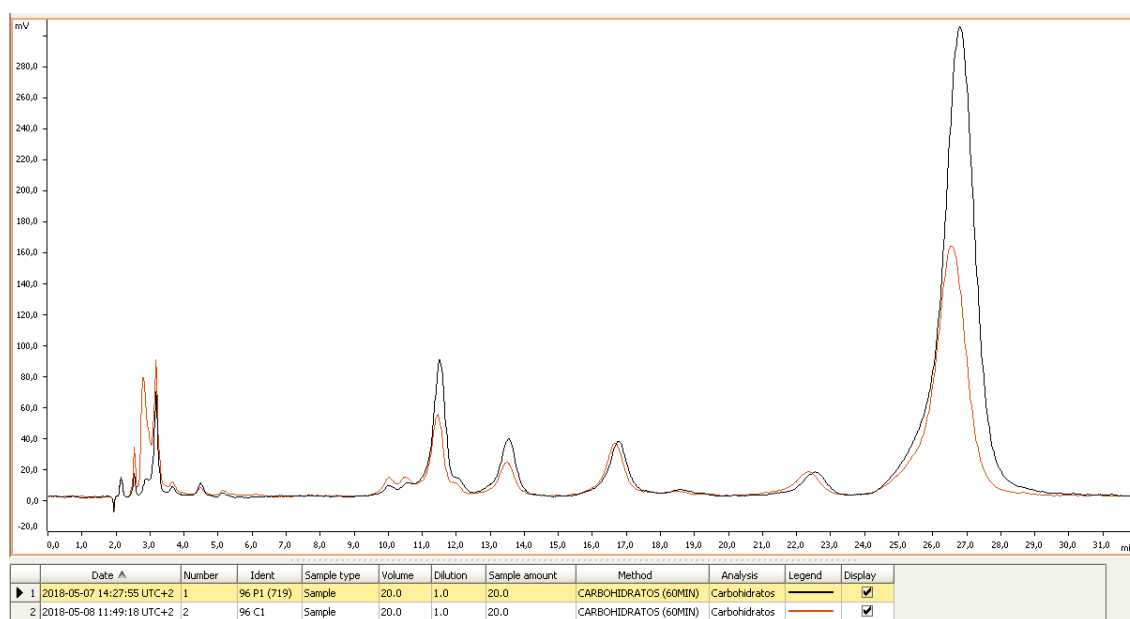


Figura 10: Cromatografía de una muestra control (negro) y un de pulgón (rojo), del tratamiento de 96 horas.

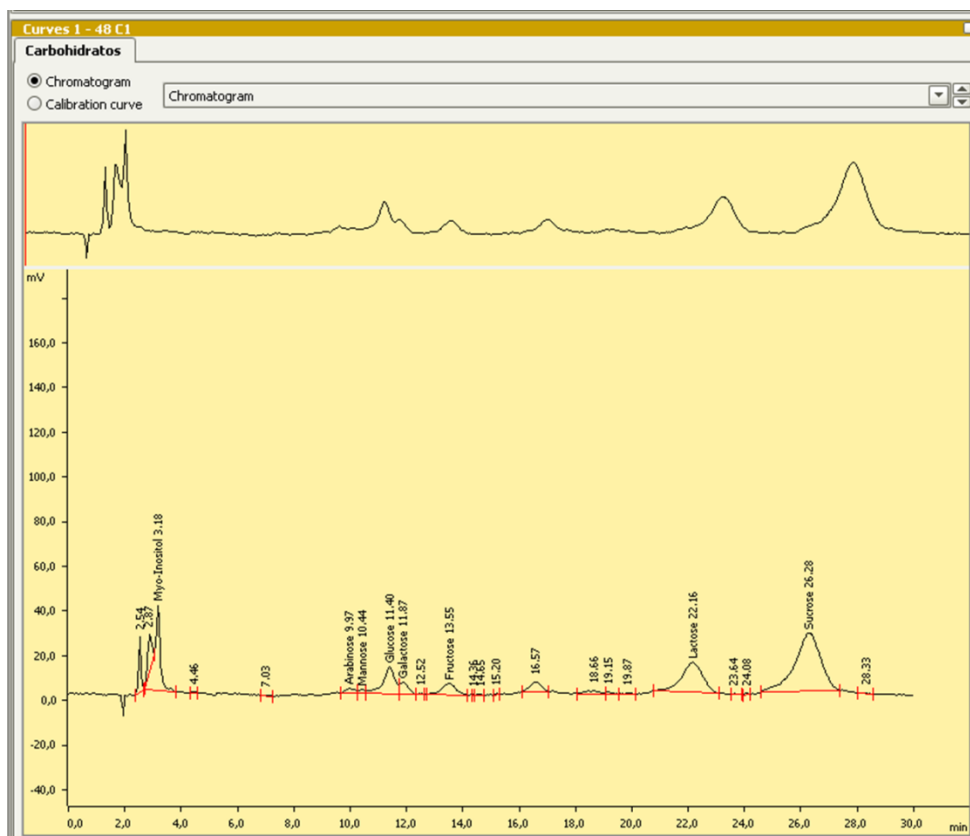


Figura 11: Cromatograma del tratamiento de 48 horas de una muestra control, (C1), donde se marcan los diferentes azúcares.

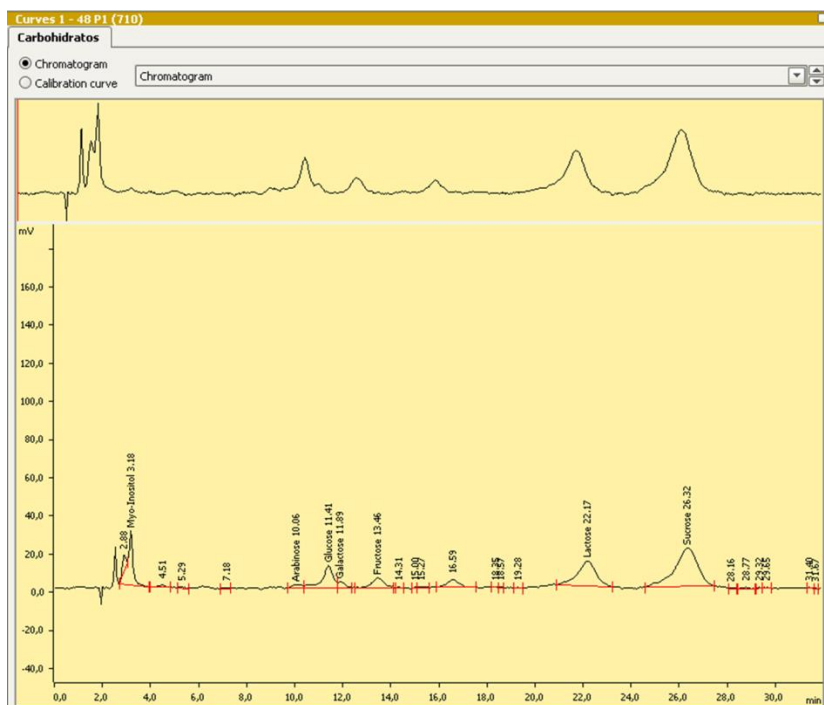


Figura 12: Cromatograma del tratamiento de 48 horas de una muestra con pulgón, (P1), donde se marcan los diferentes azúcares.

Al igual que en los aminoácidos, con Excel realicé el histograma del tratamiento de 96 horas. Los compuestos analizados, fueron los cinco siguientes, mio-inositol, glucosa, galactosa, fructosa y sacarosa. Los demás carbohidratos como la manosa, no mostraron concentraciones cuantificables en algunas de las muestras.

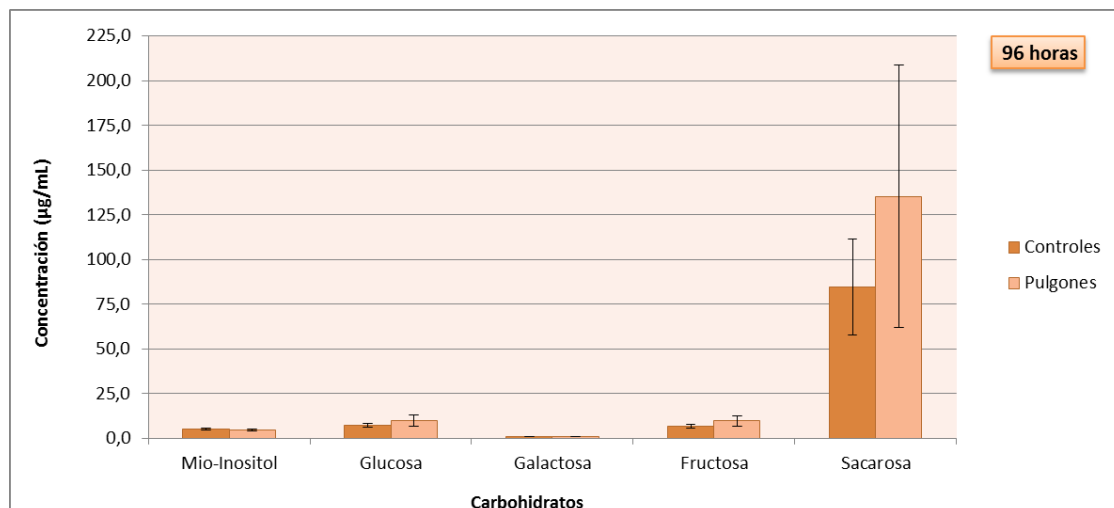


Figura 13: Representación de las medias de las muestras del tratamiento de 96 horas de los controles y del grupo con el tratamiento con del pulgón. También están marcadas con sus respectivos errores estándar. En este histograma no se aprecian diferencias significativas entre ninguno de sus componentes.

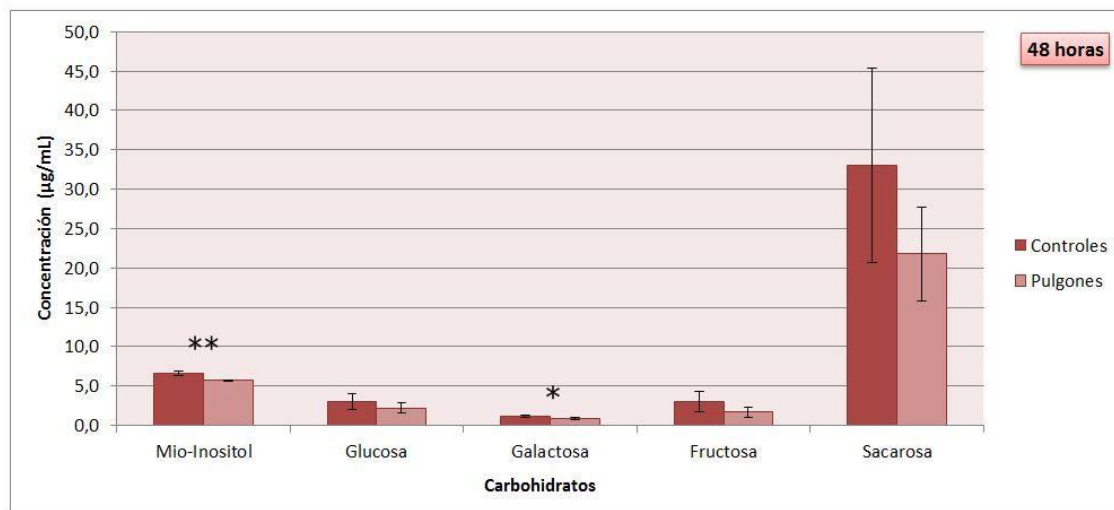


Figura 14: Representación gráfica de las medias del tratamiento de 48 horas. En el cual se pueden ver las medias de los cinco carbohidratos a estudiar con sus desviaciones estándares, y si los resultados son significativos o no por medio de un código, se marcan los resultados significativos, siendo “**” una p. valor de $0,01 > p > 0,001$; y “*” una p. valor de $0,05 > p > 0,01$.

5. Discusión

Teniendo en cuenta ambos experimentos realizados (prueba y el ensayo) se puede confirmar que es necesario el uso de las clip cages tanto en los tratamientos con pulgón como en los controles, ya que se ve que sí que afecta a las concentraciones de aminoácidos, tal y como se muestra en el figura 3. Además, con la prueba, se pueden realizar algunas suposiciones en cuanto al tratamiento de 96 horas en las concentraciones finales de los aminoácidos. Al realizar el test estadístico t de muestras independientes, se basó primero en el test de Levene para evaluar si las muestras eran independientes o no (ver Anexo apartado 8.1.3, págs 66 y 69, tablas 10 y 12). Dicho esto, las muestras significativas se mostraron en los siguientes aminoácidos: Asp, Ala, Pro, Val, Ile, y Phe (ver figura 8), aunque el aspartato y la alanina, no entran dentro del rango de la recta patrón, pero se tiene valores próximos a los extremos de esta, por este motivo se asume una linealidad, aunque estos datos no tiene valor estadístico (ver Anexo apartado 8.1.2, pág 63, tabla 8). En numerosos artículos se mencionan cuatro aminoácidos encargados del transporte del nitrógeno: Gln, Glu, Asn y Asp, (Zhou *et al.*, 2015), en estas plantas, el aspartato es el aminoácido predominante del transporte de nitrógeno ya que es el que se encuentra a más concentración que el resto. Además, el Asp, aunque sus datos estadísticos no sean del todo fiables, parece que presenta una variación, lo que podría indicar que la planta se está defendiendo, reorganizando sus nutrientes. En el caso de la Phe, la explicación de su disminución, se puede deber a que la alimentación de los pulgones causa un incremento de los niveles de la fenilalanina amonio liasa, que se trata de una enzima que produce compuestos fenólicos, provocando que la fenilalanina deje de ser un aminoácido libre, y disminuyendo así su concentración (Smith y Boyko, 2007). Por otra parte, la Phe, está implicada junto con el Trp y la Met, en la reparación del daño tisular mediante su hidrolisis, dando lugar a metabolitos secundarios, lo que también explicaría se disminución (Thompson y Goggin, 2006). En todos estos casos se ve una disminución de estos seis compuestos ante la presencia del pulgón durante 96 horas. Esto puede deberse a que el pulgón ocasiona cambios en el metabolismo de la planta, pero la verdadera cuestión es el motivo de esta alteración. Como ya se ha explicado en la introducción (apartado 1.3.1), puede deberse a que el pulgón lo altera para su propio beneficio, mejorando la relación de aminoácidos esenciales: no esenciales, y así mejorar su dieta; o bien, el pulgón provoca una respuesta de la planta, ya que esta lo reconoce como una plaga y modifica su metabolismo para dificultar el acceso a los nutrientes y así disminuir la pérdida o para que el pulgón se aleje (Thompson y Goggin, 2006). Por otra parte, no todas las relaciones entre el pulgón y la planta son iguales, ya que en algunos estudios, la alimentación del pulgón causa un incremento de la

concentración de los aminoácidos, justo lo contrario que ocurre en este experimento (Zhou *et al.*, 2015).

En el caso del ensayo que debía ser definitivo, como consecuencia de la dudosa cuantificación que observamos en los aminoácidos no realicé la parte estadística. Uno de los principales problemas, como ya he indicado en la memoria, fue la pérdida de volumen en los Eppendorf con agua a la hora de realizar la exudación. Los datos del patrón interno cistina, muestra un claro desequilibrio entre las concentraciones, ya que en todas las muestras se puede ser lo mismo: poca cantidad de aminoácidos, y los niveles de cistina alterados, ya sean más concentrado o más diluido. Dado estos valores, se midió el volumen de los Eppendorf del ensayo final ya que se buscaba una relación en cuanto a los niveles de cistina y el volumen de muestras (inversamente proporcional). No obstante, la relación entre ambos conceptos no mostró ningún patrón claro, solamente en la muestra con menor volumen sí que presentaba valores más elevados de cistina (ver tabla 6). Pero en los demás casos, había Eppendorf con volúmenes bajos que presentaban una cistina más bien diluida, y en otros casos a la inversa. Por este motivo, no se puede afirmar que la pérdida de volumen hubiera sido ocasionada por la evaporación del agua, ya que en ese caso, todos los compuestos se verían concentrados, y dado que no es el caso, se plantea una pérdida de volumen global, es decir, de todos los compuestos y no solamente de agua. La explicación de porqué no se ha obtenido resultados visibles como en la prueba, no está nada clara. Se barajan varias posibilidades:

La primera de ellas es que las hojas exudaron muy poco en comparación al día de la prueba y que además, absorbieron más agua de lo normal, lo que alteró las concentraciones de todos los compuestos. Dado que los análisis de los azúcares salieron perfectamente, ya que los niveles del patrón interno lactosa, se encontraban a la concentración adecuada, la hipótesis de que las hojas en lugar de exudar y absorbieron pierde fuerza. Aunque también cabe la posibilidad de que la exudación sea selectiva si se encuentra sometida a ciertas condiciones de temperatura y humedad. Porque en el invernadero el día del ensayo hacía más calor que en el día de la prueba.

La segunda opción, se trata de que la cistina es un aminoácido más bien inestable que puede reaccionar con relativa facilidad. La hipótesis es que la cistina dada las condiciones de temperatura del invernadero se desestabilizó y se unió a otros componentes; esto también pudo haber ocurrido con los aminoácidos libres del floema, que debido a un estrés externo como la temperatura, formasen conjugados y ya no formen parte del grupo de aminoácidos libres, por lo que aún se encontrarían en la muestra de agua, pero al formar otros compuestos, dejan de ser medibles.

Es preciso dejar constancia que ninguna de las hipótesis está demostrada ni son las únicas factibles, ya que no se sabe cierto que es lo que ocurrió.

En el caso de los azúcares, a partir del test estadístico del test de la t y con el test de Levene para la igualdad de varianzas, en el caso del tratamiento de 96 horas, no se observan diferencias significativas entre los grupos control y pulgón. Aunque en el caso del tratamiento de las 48 horas, sí que se aprecian diferencias significativas en el caso del mio-inositol y la galactosa. En ambos, casos, ocurre lo mismo que con los aminoácidos, disminuyen los dos su concentración en las muestras infestadas con el pulgón. En este caso, sí que hay estudios que coinciden con estos resultados, mostrando niveles de carbohidratos más bajos, como por ejemplo la sacarosa (Zhou *et al.*, 2015). Una posible explicación, es que los insectos que se alimentan del floema, pueden llegar a reducir la actividad fotosintética, cuando una disminución de síntesis de carbohidratos (Thompson y Goggin, 2006). Aun así, las causas de este suceso, son los mismos que en los aminoácidos, parece claro que lo provoca el pulgón a través de su presencia o por medio de los diferentes componentes químicos de su saliva. Pero el problema es saber si se trata de una modificación originada a propósito por el pulgón para mejorar la relación entre los azúcares:aminoácidos, que ya se ha mencionado que es alta (Douglas, 2003), o también porque es un método defensivo de la planta para que el predador no obtenga tantos nutrientes.

6. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos, se puede concluir lo siguiente:

1. La presencia del pulgón sí que altera la composición del floema.
2. La presencia del pulgón altera la concentración de los aminoácidos libres del floema.
3. La presencia del pulgón altera la concentración de los carbohidratos del floema.

Lo que también se puede asegurar es que este tipo de estudios que describen cómo se ve influido el floema a causa de los depredadores como el pulgón y otras plagas, pueden construir una vía para diseñar estrategias que ayuden a la disuasión de los herbívoros que se alimentan de fluido floemático, y contribuir, por tanto, al control de plagas. Por este motivo, se debe seguir investigando en este tema para comprender bien las interacciones entre ambas especies.

Conclusions

From the obtained results, we can conclude that:

1. The presence of the aphid does alter the phloem sap composition.
2. The presence of the aphid does alter free amino acids concentration on the phloem sap.
3. The presence of the aphid does alter carbohydrates concentration on the phloem sap.

These type of studies which describes how the phloem sap is influenced by predators such as aphids or other pests are very useful to design strategies to help the deterrence of phloem-eating herbivores, thus contributing to pest control. For these reasons, further research is required to understand the interactions between aphids and their host plant.

7. Bibliografía

1. Azcón-Bieto, J. y Talón, M. (2009). Fundamentos de Fisiología Vegetal 2nd ed. Publicacions i Edicions de la Universitat de Barcelona. McGraw Hill Education.
2. Dogimont, C., Bendahmane, A., Chovelon, V. y Boissot, N. (2010). Host plant resistance to aphids in cultivated crops: Genetic and molecular bases, and interactions with aphid populations. *Comptes Rendus Biologies*, 333: 566-573.
3. Douglas, A. (2003). The Nutritional Physiology of Aphids. *Advances in Insect Physiology*, 31: 73-140.
4. Elzinga, D. and Jander, G. (2013). The role of protein effectors in plant–aphid interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 16: 451-456.
5. Florencio-Ortiz, V., Sellés-Marchart, S., Zubcoff-Vallejo, J., Jander, G. y Casas, J.L. (2018). Changes in the free amino acid composition of *Capsicum annuum* (pepper) leaves in response to *Myzus persicae* (green peach aphid) infestation. A comparison with water stress. *PloS ONE* 13(6): e0198093. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198093>.
6. Giordanengo, P., Brunissen, L., Rusterucci, C., Vincent, C., van Bel, A., Dinant, S., Gironse, C., Faucher, M. y Bonnemain, J. (2010). Compatible plant-aphid interactions: How aphids manipulate plant responses. *Comptes Rendus Biologies*, 333: 516-523.
7. Goggin, F. (2007). Plant–aphid interactions: molecular and ecological perspectives. *Current Opinion in Plant Biology*, 10: 399-408.
8. Guerrieri, E. y Digilio, M. (2008). Aphid-plant interactions: a review. *Journal of Plant Interactions*, 3: 223-232.
9. Harder, U., Koletzko, B. y Peissner, W. (2011). Quantification of 22 plasma amino acids combining derivatization and ion-pair LC–MS/MS. *Journal of Chromatography B*, 879: 495-504.
10. Howe, G. y Jander, G. (2008). Plant Immunity to Insect Herbivores. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 41-66.
11. King, R. y Zeevaart, J. (1974). Enhancement of Phloem Exudation from Cut Petioles by Chelating Agents. *Plant Physiology*, 53: 96-103.
12. Mithöfer, A. y Boland, W. (2012). Plant Defense Against Herbivores: Chemical Aspects. *Annual Review of Plant Biology*, 63: 431-450.
13. Parra, N., Yang, Y. y Zang, L. (2013). Quantitative Analysis of Underivatized Glutamine, Glutamic Acid, Asparagine, and Aspartic Acid in Cell Media using Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS. *Agilent Technologies, Inc*, pp.1-9.

14. Rasmann, S. y Agrawal, A. (2009). Plant defense against herbivory: progress in identifying synergism, redundancy, and antagonism between resistance traits. *Current Opinion in Plant Biology*, 12: 473-478.
15. Saguez, J., Giordanengo, P. y Vincent, C. (2013). Aphids as major potato pests. En: Giordanengo, P., Vincent, C. y Alyokhin, A. (eds.). *Insect Pest of Potato. Global Perspectives on Biology and Management*, Elsevier, pp.: 31-62.
16. Schwachtje, J. y Baldwin, I. (2008). Why Does Herbivore Attack Reconfigure Primary Metabolism?. *Plant Physiology*, 146: 845-851.
17. Smith, C. y Boyko, E. (2007). The molecular bases of plant resistance and defense responses to aphid feeding: current status. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 122: 1-16.
18. Tetyuk, O., Benning, U. y Hoffmann-Benning, S. (2013). Collection and Analysis of Arabidopsis Phloem Exudates Using the EDTA-facilitated Method. *Journal of Visualized Experiments*, 23: e51111, doi: 10.3791/51111.
19. Thompson, G. y Goggin, F. (2006). Transcriptomics and functional genomics of plant defence induction by phloem-feeding insects. *Journal of Experimental Botany*, 57: 755-766.
20. Vashishtha, A., Rathi, B., Kaushik, S., Sharma, K. y Lakhanpaul, S. (2013). Phloem sap analysis of *Schleichera oleosa* (Lour) Oken, *Butea monosperma* (Lam) Taub. and *Ziziphus mauritiana* (Lam) and hemolymph of *Kerria lacca* (Kerr) using HPLC and tandem mass spectrometry. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 19: 537-545.
21. Will, T. y Vilcinskas, A. (2015). The structural sheath protein of aphids is required for phloem feeding. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 57:34-40.
22. Zhou, S., Lou, Y., Tzin, V. y Jander, G. (2015). Alteration of plant primary metabolism in response to insect herbivory. *Plant Physiology*, 169: 1488-1498.
23. https://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Leaf_Structure_es.svg

8. Anexos

8.1 Prueba Aminoácidos

8.1.1 Rectas patrones de los aminoácidos.

Rectas patrón de todos los aminoácidos a analizar. Desde concentración de 0,25 a 10 ppm ($\mu\text{g/mL}$). En algunos casos se omite el punto de 10 ppm ya que se desvía de la linealidad. Esta omisión se hace sobre todo en las muestras donde la concentración final está por debajo de los 5 ppm.

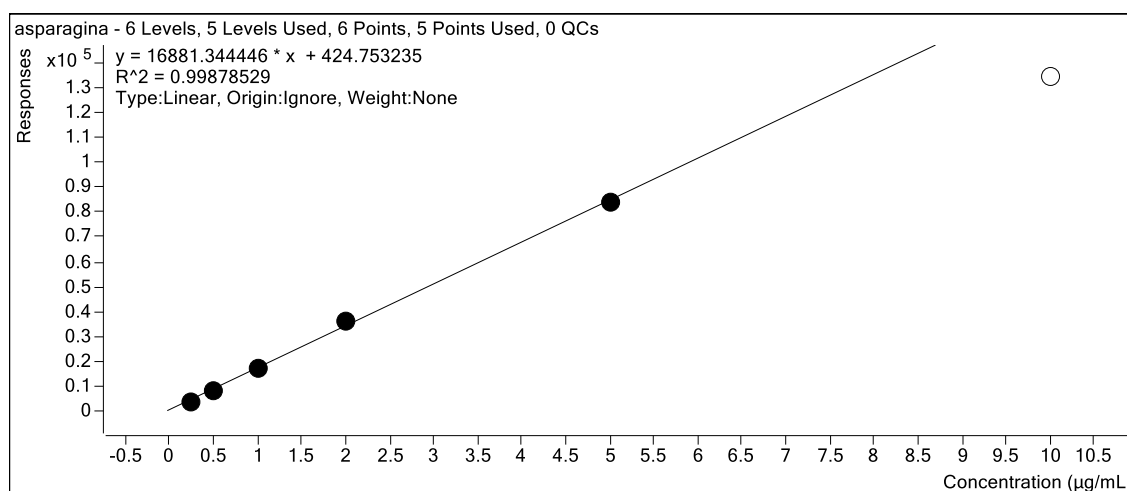


Figura 15: Recta patrón para asparagina. Se muestra el coeficiente de correlación y la ecuación de la recta.

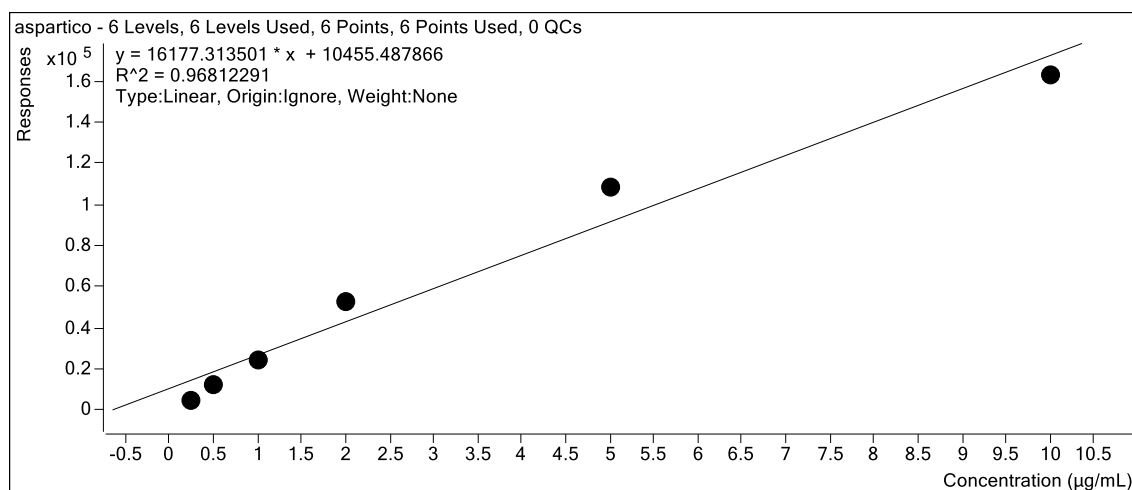


Figura 16: Recta patrón para ácido aspártico. Se muestra el coeficiente de correlación y la ecuación de la recta.

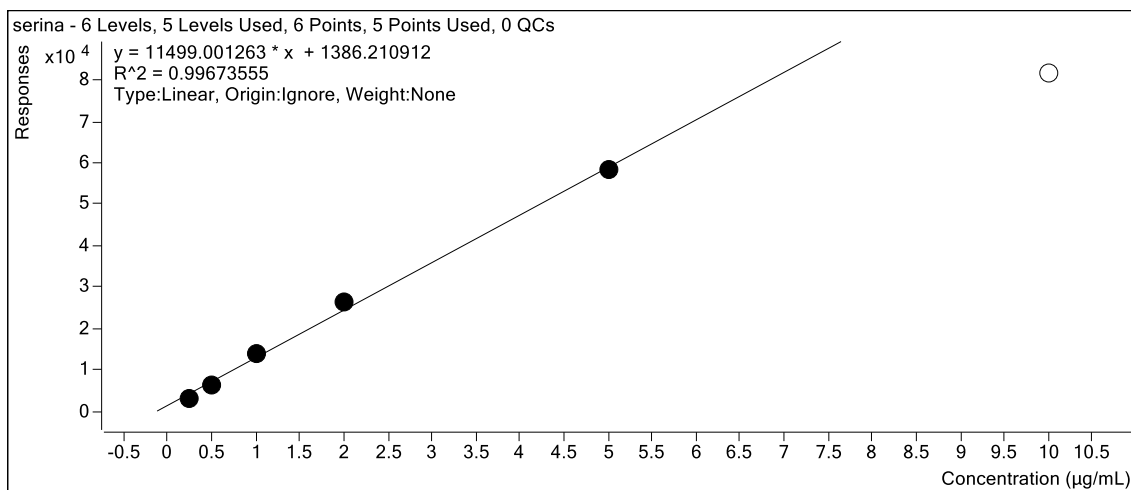


Figura 17: Recta patrón para serina. Se muestra el coeficiente de correlación y la ecuación de la recta.

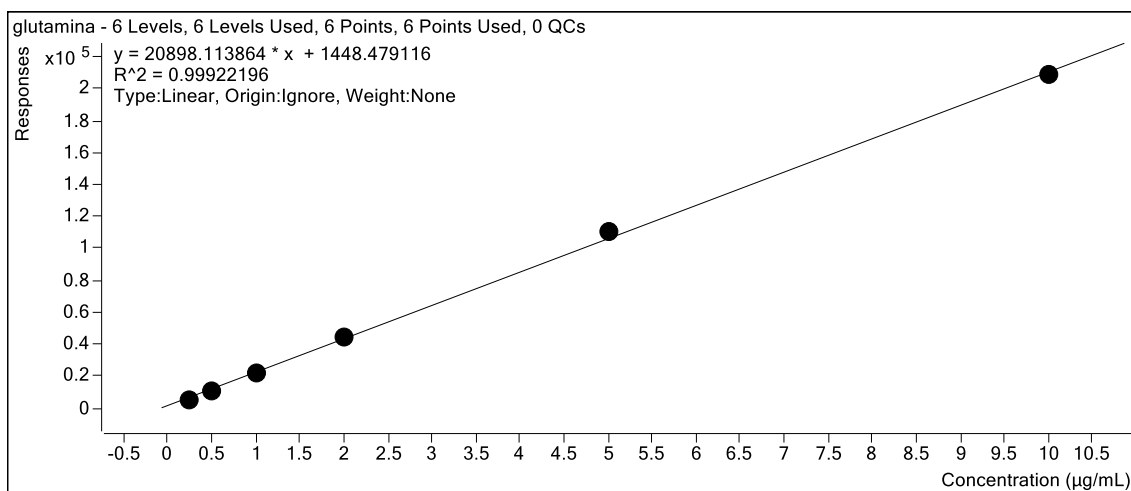


Figura 18: Recta patrón para glutamina. Se muestra el coeficiente de correlación y la ecuación de la recta.

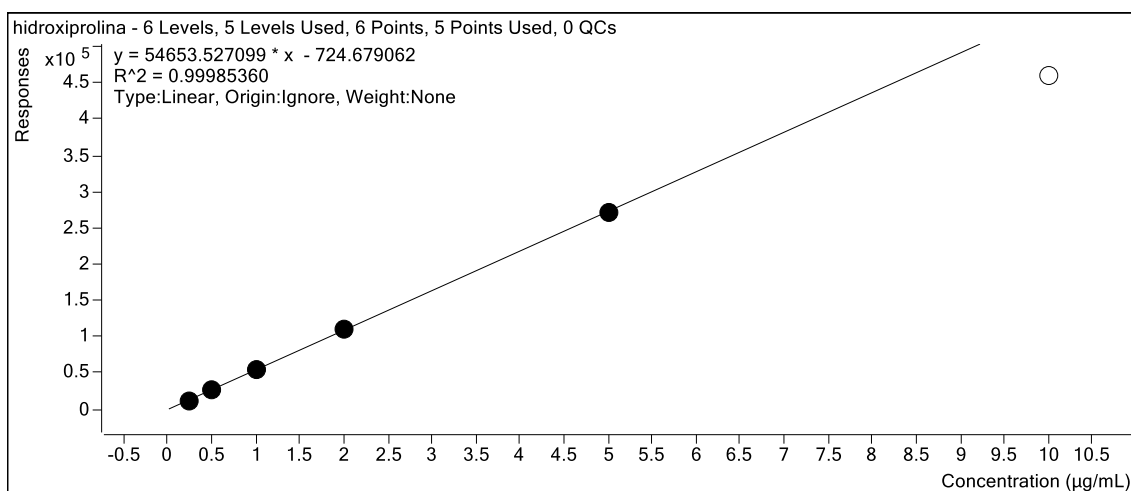


Figura 19: Recta patrón para hidroxiprolina. Se muestra el coeficiente de correlación y la ecuación de la recta.

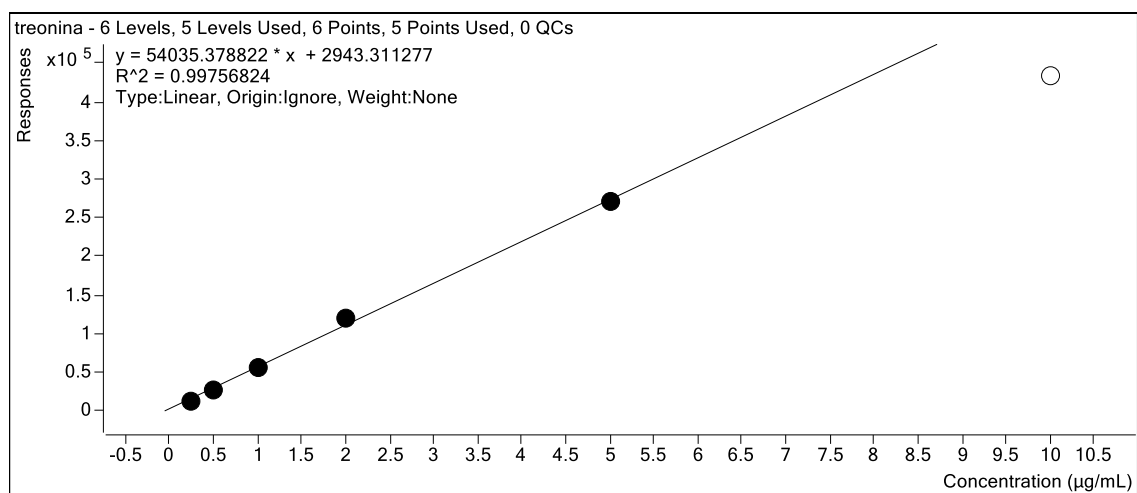


Figura 20: Recta patrón para treonina. Se muestra el coeficiente de correlación y la ecuación de la recta.

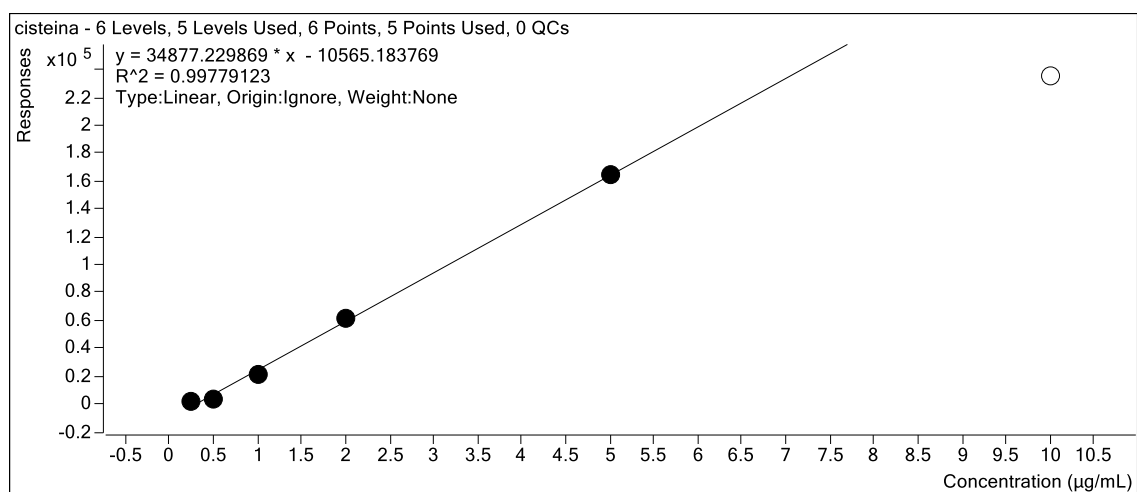


Figura 21: Recta patrón para cisteína. Se muestra el coeficiente de correlación y la ecuación de la recta.

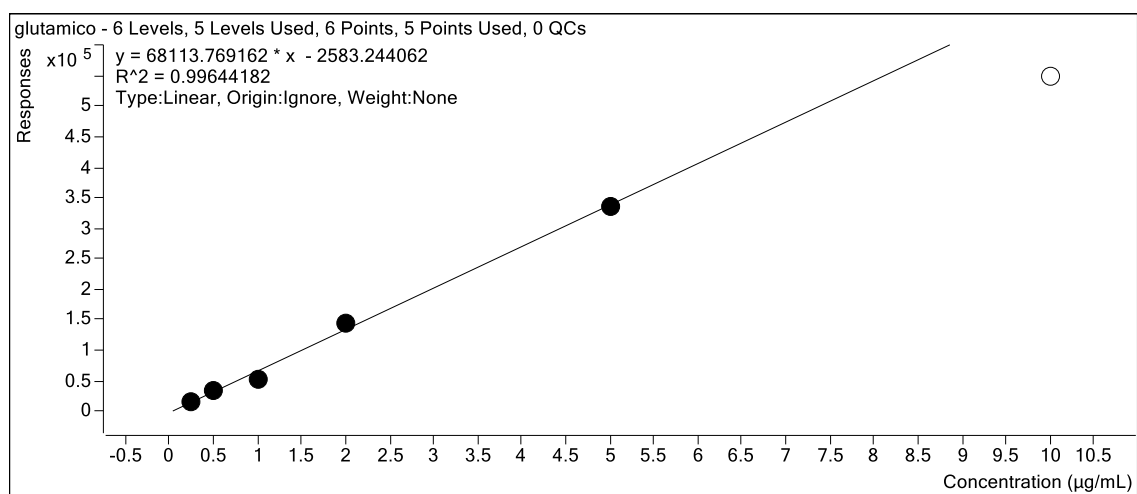


Figura 22: Recta patrón para ácido glutámico. Se muestra el coeficiente de correlación y la ecuación de la recta.

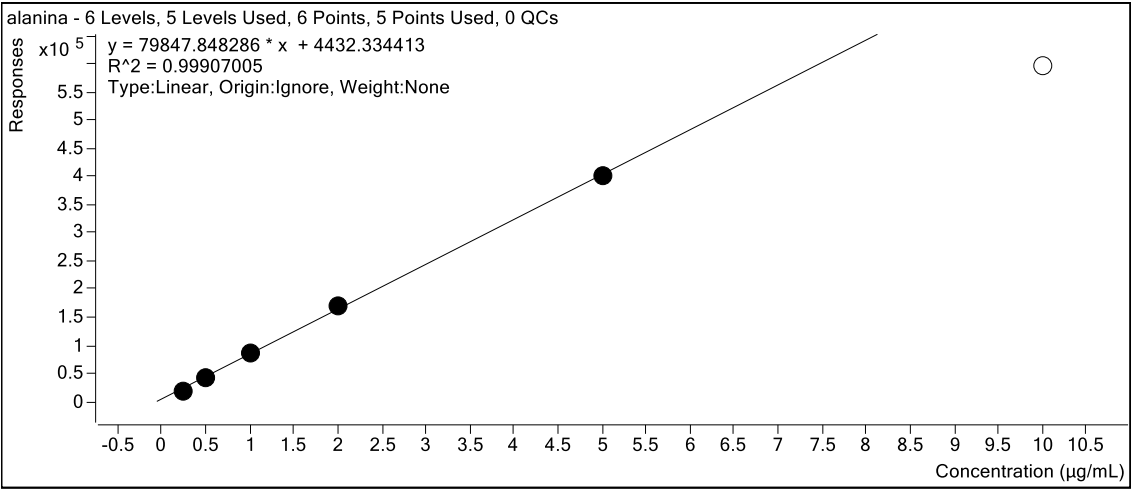


Figura 23: Recta patrón para alanina. Se muestra el coeficiente de correlación y la ecuación de la recta.

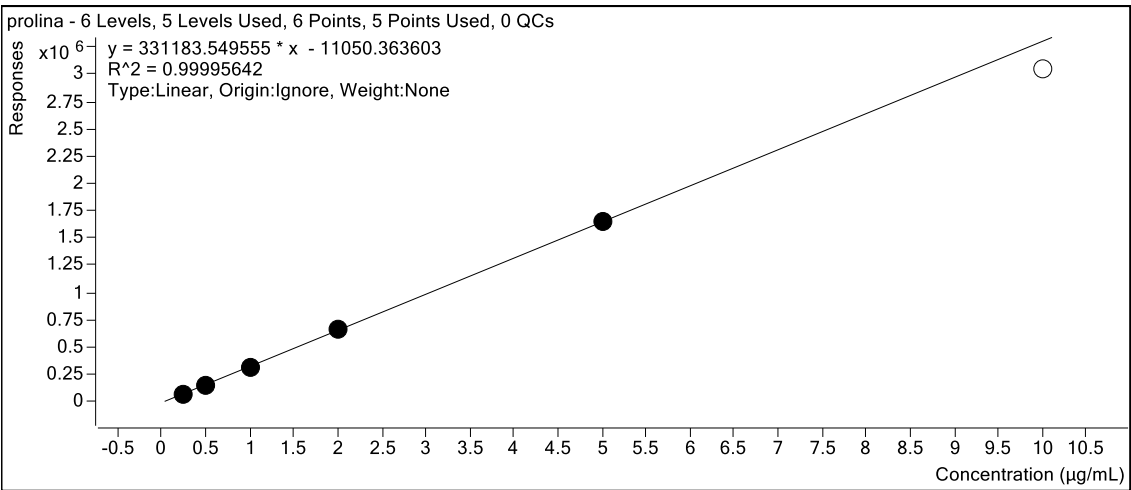


Figura 24: Recta patrón para prolina. Se muestra el coeficiente de correlación y la ecuación de la recta.

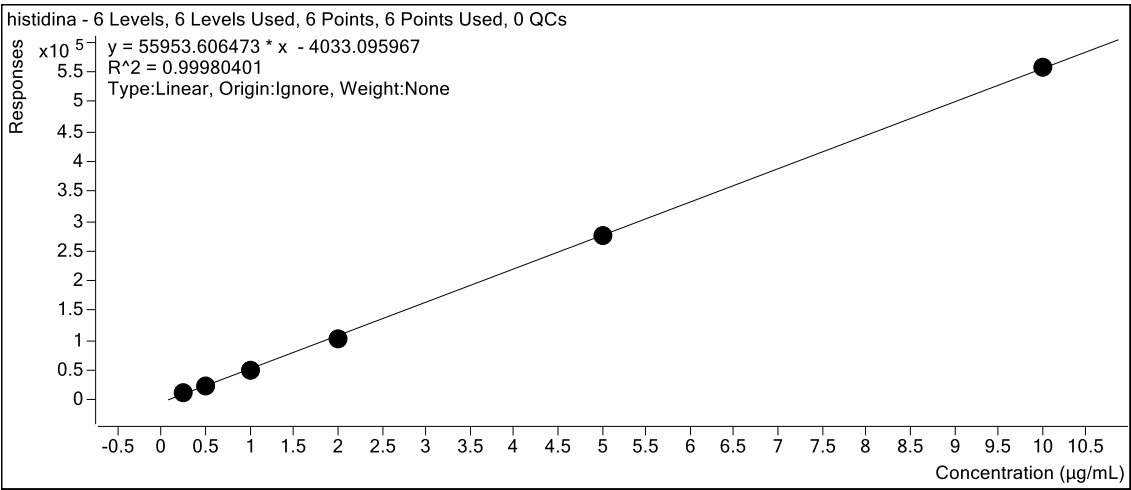


Figura 25: Recta patrón para histidina. Se muestra el coeficiente de correlación y la ecuación de la recta.

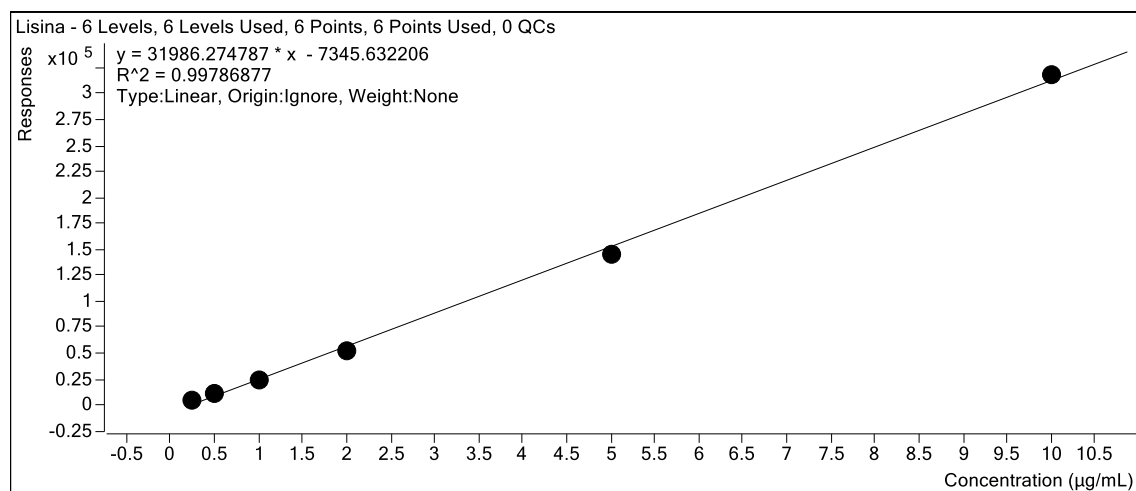


Figura 26: Recta patrón para lisina. Se muestra el coeficiente de correlación y la ecuación de la recta.

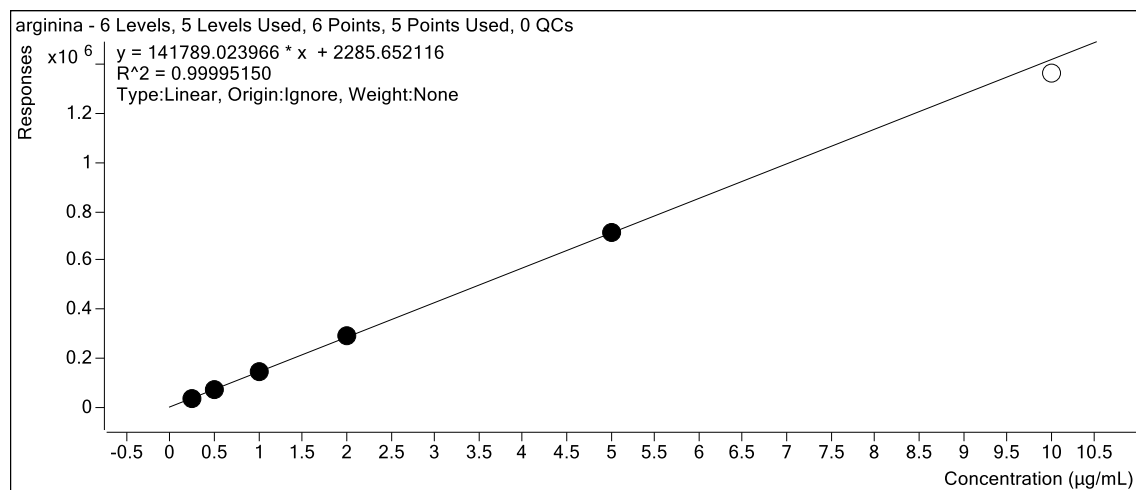


Figura 27: Recta patrón para arginina. Se muestra el coeficiente de correlación y la ecuación de la recta.

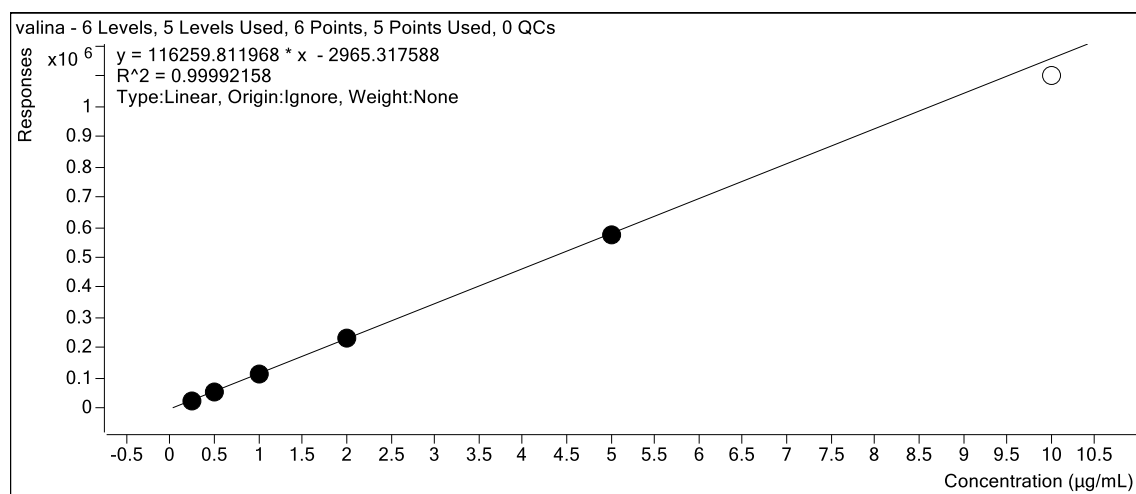


Figura 28: Recta patrón para valina. Se muestra el coeficiente de correlación y la ecuación de la recta.

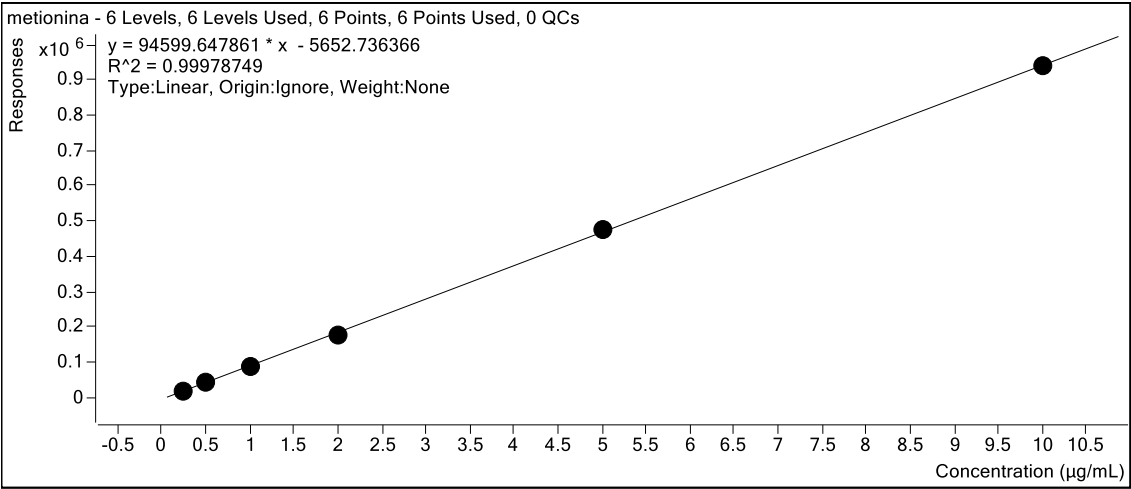


Figura 29: Recta patrón para metionina. Se muestra el coeficiente de correlación y la ecuación de la recta.

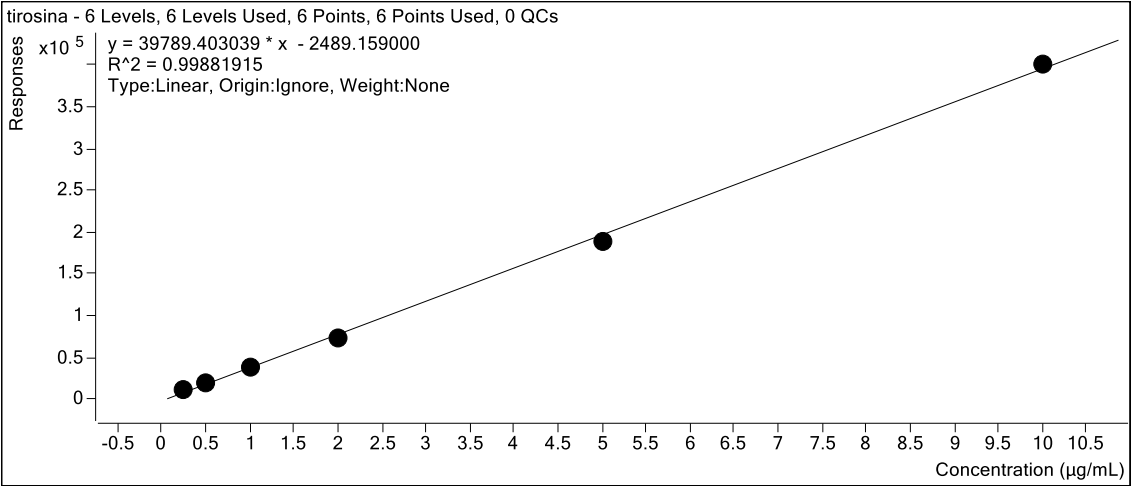


Figura 30: Recta patrón para tirosina. Se muestra el coeficiente de correlación y la ecuación de la recta.

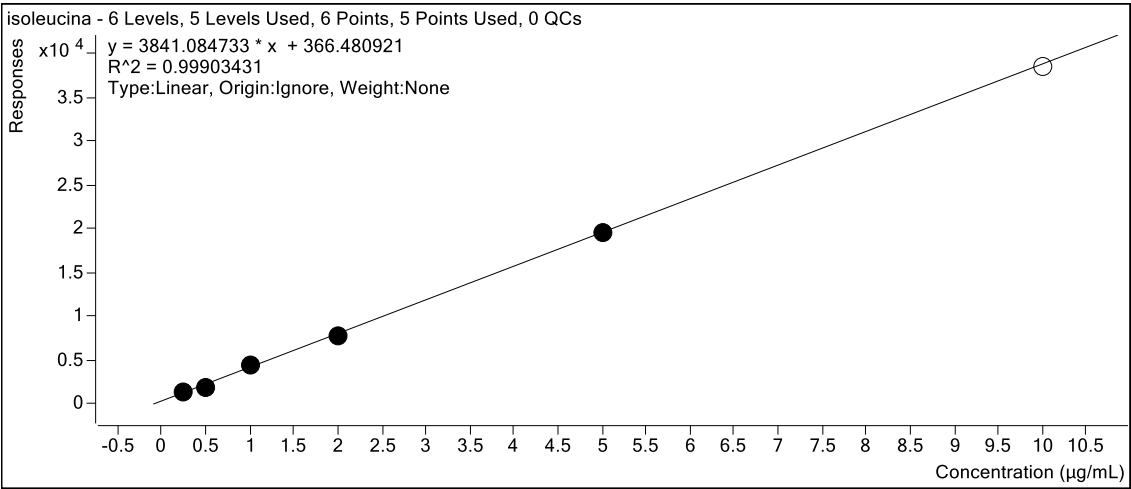


Figura 31: Recta patrón para isoleucina. Se muestra el coeficiente de correlación y la ecuación de la recta.

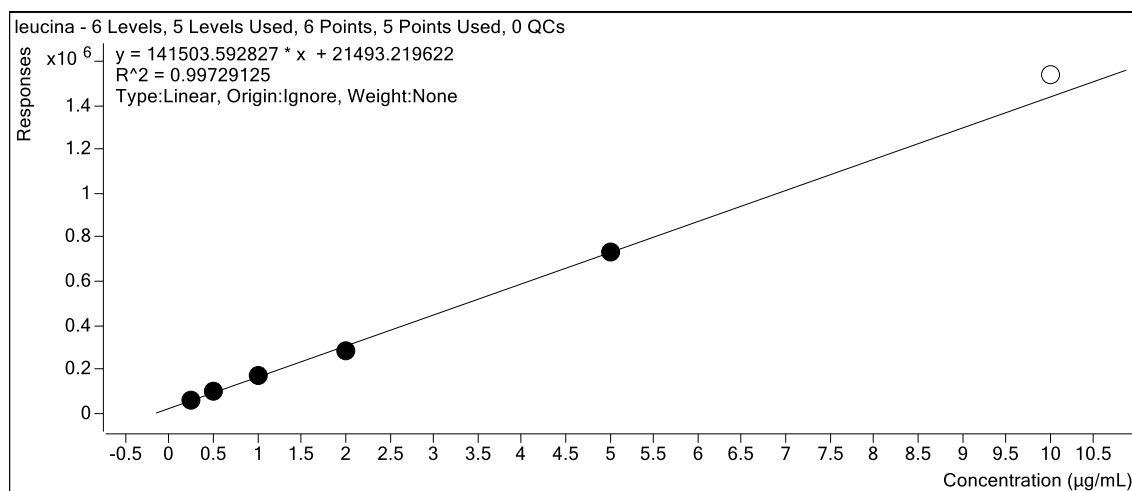


Figura 32: Recta patrón para leucina. Se muestra el coeficiente de correlación y la ecuación de la recta.

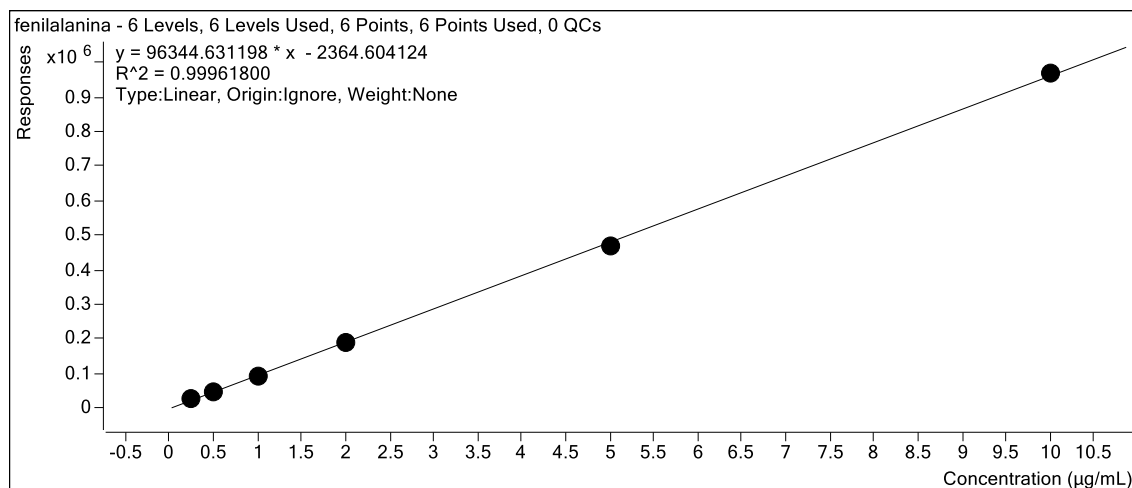


Figura 33: Recta patrón para fenilalanina. Se muestra el coeficiente de correlación y la ecuación de la recta.

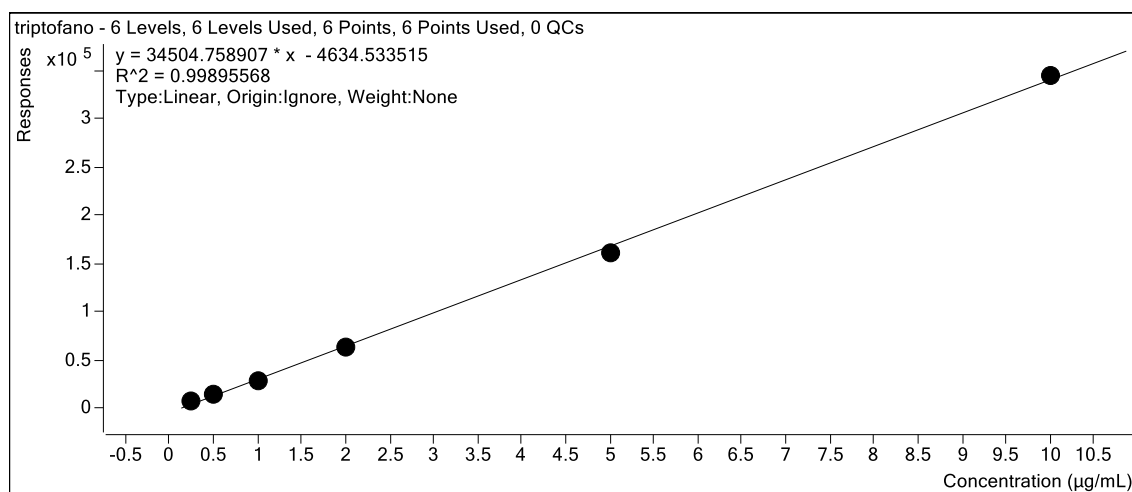


Figura 34: Recta patrón para triptófano. Se muestra el coeficiente de correlación y la ecuación de la recta.

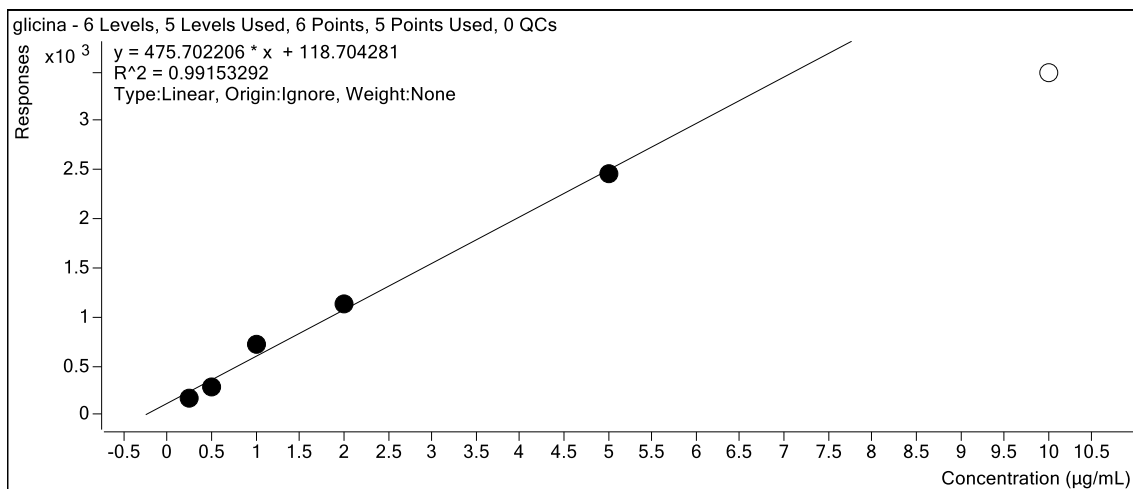


Figura 35: Recta patrón para glicina. Se muestra el coeficiente de correlación y la ecuación de la recta.

8.1.2 Concentraciones aa.

Tabla 8: Concentraciones finales en ppm (µg/mL) de los aminoácidos en todas las muestras de la prueba de 96 horas. También se incluyen sus respectivas medias y desviaciones estándar.

Tratamiento 96 horas	Asn	Asp	Ser	Hyp	Gln	Thr	Glu	Ala	Pro	His	Lys
Control (C)	1,0079	3,8617	4,0353	0,1598	11,3794	1,7769	4,0109	0,6162	2,2784	0,2259	1,5886
Control (C)	0,3851	3,0543	1,5706	0,0927	1,5852	0,3666	1,3004	0,0000	0,6760	0,1644	0,7359
Control (C)	0,6654	5,0376	3,1798	0,1313	4,0979	1,1093	2,3861	0,3273	1,3260	0,1846	0,9966
Control (C)	0,5836	3,1231	3,1286	0,1180	4,6920	0,8850	1,6165	0,1885	1,0684	0,1791	0,8794
C. Clip Cages (CC)	1,9208	14,5098	4,4677	0,2629	8,0872	2,7938	4,1948	0,4145	2,5942	0,7304	3,3763
C. Clip Cages (CC)	1,6355	15,8083	4,7689	0,2079	8,0979	3,1310	6,1478	0,6722	3,1472	0,9449	4,0607
C. Clip Cages (CC)	1,7405	10,7334	4,7948	0,2265	8,9438	2,9560	3,9035	0,5183	2,2566	0,3925	2,5616
C. Clip Cages (CC)	1,0465	12,6028	3,1450	0,1819	3,3080	1,3624	2,8436	0,1651	2,2271	0,3076	1,8932
Pulgón (P)	1,2019	8,7769	4,3665	0,1946	3,3505	1,4539	1,9813	0,0404	1,3057	0,4229	2,1496
Pulgón (P)	1,3956	8,8249	5,7122	0,1692	4,2433	1,8269	2,0531	0,2253	1,6581	0,3828	1,9517
Pulgón (P)	0,3761	4,6543	2,3249	0,0879	0,9448	0,5131	0,7456	0,0517	0,6618	0,2186	0,9720
Pulgón (P)	1,2552	9,9624	6,1339	0,1977	4,9611	1,9894	2,6954	0,1843	1,6391	0,3305	1,9970

Tratamiento 96 horas	Asn	Asp	Ser	Hyp	Gln	Thr	Glu	Ala	Pro	His	Lys
Media (C)	0,6605	3,7692	2,9786	0,1254	5,4386	1,0344	2,3285	0,2830	1,3372	0,1885	1,0501
Desviación estándar (C)	0,2598	0,9212	1,0266	0,0279	4,1832	0,5846	1,2107	0,2595	0,6820	0,0264	0,3745
Media (CC)	1,5858	13,4136	4,2941	0,2198	7,1092	2,5608	4,2724	0,4425	2,5563	0,5939	2,9729
Desviación estándar (CC)	0,3783	2,2194	0,7803	0,0340	2,5658	0,8107	1,3785	0,2131	0,4277	0,2969	0,9453
Media (P)	1,0572	8,0546	4,6344	0,1623	3,3749	1,4458	1,8688	0,1254	1,3162	0,3387	1,7676
Desviación estándar (P)	0,4614	2,3322	1,7142	0,0512	1,7489	0,6610	0,8148	0,0933	0,4653	0,0886	0,5371

Tratamiento 96 horas	Arg	Val	Met	Tyr	Ile	Leu	Phe	Trp	Cys	Gly
Control (C)	0,1102	1,8111	0,3107	0,6329	0,7235	0,7009	1,1480	0,3636	0,5003	N.D.
Control (C)	0,0586	0,4923	0,1441	0,5674	0,4571	1,0846	0,5742	0,3432	0,4676	N.D.
Control (C)	0,0815	1,0468	0,1960	0,6229	0,6581	0,5008	0,5679	0,3398	0,4777	N.D.
Control (C)	0,0672	0,7966	0,1778	0,5681	0,5499	0,3995	0,5815	0,3417	0,4678	N.D.
C. Clip Cages (CC)	0,9091	3,1005	0,2455	1,1162	1,8001	1,7587	1,4210	0,5799	0,4965	N.D.
C. Clip Cages (CC)	1,9021	3,9261	0,2138	1,5393	2,1966	4,4543	1,6623	0,5859	0,5143	N.D.
C. Clip Cages (CC)	0,4964	2,5551	0,2733	0,9603	1,4006	2,4738	1,5499	0,5003	0,5002	N.D.
C. Clip Cages (CC)	0,3715	1,4414	0,1700	0,8107	0,9740	0,7870	0,8273	0,4325	0,4800	N.D.
Pulgón (P)	0,5210	1,4429	0,2230	0,8276	0,8079	0,9010	0,9621	0,4921	0,4692	N.D.
Pulgón (P)	0,4227	1,6659	0,3086	0,8790	1,1116	1,1193	0,9433	0,4992	0,4881	0,0009
Pulgón (P)	0,1588	0,5940	0,1512	0,6618	0,5173	0,4198	0,5569	0,3722	0,4596	N.D.
Pulgón (P)	0,3693	1,6364	0,2429	0,7904	0,9185	1,9665	0,8897	0,4244	0,4858	N.D.

Tratamiento 96 horas	Arg	Val	Met	Tyr	Ile	Leu	Phe	Trp	Cys	Gly
Media (C)	0,0794	1,0367	0,2071	0,5978	0,5972	0,6714	0,7179	0,3471	0,4783	N.D.
Desviación estándar (C)	0,0226	0,5639	0,0723	0,0350	0,1176	0,3026	0,2868	0,0111	0,0154	N.D.
Media (CC)	0,9198	2,7558	0,2256	1,1066	1,5928	2,3684	1,3651	0,5247	0,4977	N.D.
Desviación estándar (CC)	0,6940	1,0418	0,0443	0,3143	0,5252	1,5530	0,3719	0,0728	0,0141	N.D.
Media (P)	0,3680	1,3348	0,2314	0,7897	0,8388	1,1016	0,8380	0,4470	0,4757	N.D.
Desviación estándar (P)	0,1529	0,5037	0,0648	0,0927	0,2484	0,6464	0,1899	0,0602	0,0136	N.D.

8.1.3 Resultados estadísticos (SPSS)

Tabla 9: Resultados obtenidos con el programa SPSS de las comparaciones entre los grupos control (0) y controles con clip cages (1). Se indica el número de réplicas, las medias y la desviación típica.

Estadísticos de grupo

Tratamiento	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Asn ,00	4	,6605	,25977	,12988
1,00	4	1,5858	,37835	,18917
Asp ,00	4	3,7692	,92124	,46062
1,00	4	13,4136	2,21940	1,10970
Ser ,00	4	2,9786	1,02665	,51332
1,00	4	4,2941	,78031	,39015
Hyp ,00	4	,1255	,02794	,01397
1,00	4	,2198	,03404	,01702
Gln ,00	4	5,4386	4,18318	2,09159
1,00	4	7,1092	2,56576	1,28288
Thr ,00	4	1,0344	,58458	,29229
1,00	4	2,5608	,81073	,40536
Glu ,00	4	2,3285	1,21074	,60537
1,00	4	4,2724	1,37850	,68925
Ala ,00	4	,2830	,25952	,12976
1,00	4	,4425	,21313	,10656
Pro ,00	4	1,3372	,68198	,34099
1,00	4	2,5563	,42768	,21384
His ,00	4	,1885	,02637	,01319
1,00	4	,5939	,29686	,14843
Lys ,00	4	1,0501	,37449	,18724
1,00	4	2,9729	,94534	,47267
Arg ,00	4	,0794	,02259	,01129
1,00	4	,9198	,69402	,34701
Val ,00	4	1,0367	,56386	,28193
1,00	4	2,7558	1,04183	,52091
Met ,00	4	,2071	,07230	,03615
1,00	4	,2256	,04434	,02217
Tyr ,00	4	,5978	,03498	,01749
1,00	4	1,1066	,31426	,15713
Ile ,00	4	,5972	,11765	,05882
1,00	4	1,5928	,52518	,26259
Leu ,00	4	,6714	,30257	,15129
1,00	4	2,3685	1,55295	,77648
Phe ,00	4	,7179	,28680	,14340
1,00	4	1,3651	,37187	,18593
Trp ,00	4	,3471	,01110	,00555
1,00	4	,5247	,07277	,03638
Cys ,00	4	,4784	,01536	,00768
1,00	4	,4977	,01409	,00704

Tabla 10: Resultados estadísticos obtenidos con el programa SPSS para la comparación de medias de muestras independientes, en los aminoácidos de la prueba de 96 horas, entre los grupos control y control con clip cages. Con el test de Levene se indican se las varianzas son iguales o no, en el caso de que sea significativo ($p > 0,05$), se asumen varianzas distintas. Para la prueba t, se mira el valor

significativo según el test de Levene. En negrita se han marcado los datos utilizados para el trabajo, y los valores subrayados, indican los valores significativos.

Prueba de muestras independientes										
		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Superior	Inferior
Asn	Se han asumido varianzas iguales	0,4839	0,5127	-4,0326	6,0000	<u>0,0069</u>	-0,9254	0,2295	-1,4869	-0,3639
	No se han asumido varianzas iguales			-4,0326	5,3142	0,0088	-0,9254	0,2295	-1,5049	-0,3458
Asp	Se han asumido varianzas iguales	4,1441	0,0880	-8,0270	6,0000	<u>0,0002</u>	-9,6444	1,2015	-12,5844	-6,7044
	No se han asumido varianzas iguales			-8,0270	4,0040	0,0013	-9,6444	1,2015	-12,9790	-6,3098
Ser	Se han asumido varianzas iguales	0,1193	0,7416	-2,0403	6,0000	0,0874	-1,3155	0,6448	-2,8932	0,2622
	No se han asumido varianzas iguales			-2,0403	5,5988	0,0908	-1,3155	0,6448	-2,9210	0,2900
Hyp	Se han asumido varianzas iguales	0,1583	0,7045	-4,2843	6,0000	<u>0,0052</u>	-0,0943	0,0220	-0,1482	-0,0405
	No se han asumido varianzas iguales			-4,2843	5,7806	0,0056	-0,0943	0,0220	-0,1487	-0,0400
Gln	Se han asumido varianzas iguales	0,6102	0,4644	-0,6809	6,0000	0,5214	-1,6706	2,4537	-7,6745	4,3333
	No se han asumido varianzas iguales			-0,6809	4,9774	0,5263	-1,6706	2,4537	-7,9866	4,6454
Thr	Se han asumido varianzas iguales	0,4881	0,5109	-3,0542	6,0000	<u>0,0224</u>	-1,5264	0,4998	-2,7492	-0,3035
	No se han asumido varianzas iguales			-3,0542	5,4557	0,0253	-1,5264	0,4998	-2,7794	-0,2733
Glu	Se han asumido varianzas iguales	0,0155	0,9051	-2,1191	6,0000	<u>0,0784</u>	-1,9439	0,9174	-4,1886	0,3007
	No se han asumido varianzas iguales			-2,1191	5,9017	0,0792	-1,9439	0,9174	-4,1977	0,3098
Ala	Se han asumido varianzas iguales	0,1520	0,7101	-0,9500	6,0000	0,3788	-0,1595	0,1679	-0,5704	0,2513
	No se han asumido varianzas iguales			-0,9500	5,7814	0,3801	-0,1595	0,1679	-0,5742	0,2551
Pro	Se han asumido varianzas iguales	0,4415	0,5311	-3,0288	6,0000	<u>0,0231</u>	-1,2191	0,4025	-2,2039	-0,2342
	No se han asumido varianzas iguales			-3,0288	5,0436	0,0288	-1,2191	0,4025	-2,2510	-0,1871
His	Se han asumido varianzas iguales	22,2819	0,0033	-2,7203	6,0000	0,0346	-0,4054	0,1490	-0,7700	-0,0407
	No se han asumido varianzas iguales			-2,7203	3,0473	<u>0,0713</u>	-0,4054	0,1490	-0,8754	0,0647
Lys	Se han asumido varianzas iguales	4,6277	0,0750	-3,7821	6,0000	<u>0,0092</u>	-1,9228	0,5084	-3,1669	-0,6788
	No se han asumido varianzas iguales			-3,7821	3,9189	0,0201	-1,9228	0,5084	-3,3460	-0,4997
Arg	Se han asumido varianzas iguales	5,6289	0,0553	-2,4205	6,0000	0,0518	-0,8404	0,3472	-1,6899	0,0092
	No se han asumido varianzas iguales			-2,4205	3,0064	0,0939	-0,8404	0,3472	-1,9440	0,2632
Val	Se han asumido varianzas iguales	1,2320	0,3095	-2,9023	6,0000	<u>0,0273</u>	-1,7191	0,5923	-3,1684	-0,2697
	No se han asumido varianzas iguales			-2,9023	4,6186	0,0370	-1,7191	0,5923	-3,2802	-0,1579

Prueba de muestras independientes										
		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Superior	Inferior
Met	Se han asumido varianzas iguales	0,6183	0,4616	-0,4365	6,0000	0,6777	-0,0185	0,0424	-0,1223	0,0853
	No se han asumido varianzas iguales			-0,4365	4,9773	0,6807	-0,0185	0,0424	-0,1277	0,0906
Tyr	Se han asumido varianzas iguales	4,3473	<u>0,0822</u>	-3,2181	6,0000	<u>0,0182</u>	-0,5088	0,1581	-0,8956	-0,1219
	No se han asumido varianzas iguales			-3,2181	3,0743	0,0470	-0,5088	0,1581	-1,0051	-0,0125
Ile	Se han asumido varianzas iguales	6,6293	<u>0,0421</u>	-3,7001	6,0000	0,0101	-0,9957	0,2691	-1,6542	-0,3372
	No se han asumido varianzas iguales			-3,7001	3,3003	<u>0,0291</u>	-0,9957	0,2691	-1,8096	-0,1817
Leu	Se han asumido varianzas iguales	3,6516	0,1046	-2,1452	6,0000	0,0756	-1,6970	0,7911	-3,6327	0,2387
	No se han asumido varianzas iguales			-2,1452	3,2274	0,1149	-1,6970	0,7911	-4,1171	0,7231
Phe	Se han asumido varianzas iguales	0,1858	0,6815	-2,7564	6,0000	<u>0,0330</u>	-0,6472	0,2348	-1,2218	-0,0727
	No se han asumido varianzas iguales			-2,7564	5,6362	0,0352	-0,6472	0,2348	-1,2309	-0,0636
Trp	Se han asumido varianzas iguales	12,4241	<u>0,0124</u>	-4,8247	6,0000	0,0029	-0,1776	0,0368	-0,2676	-0,0875
	No se han asumido varianzas iguales			-4,8247	3,1396	<u>0,0153</u>	-0,1776	0,0368	-0,2918	-0,0633
Cys	Se han asumido varianzas iguales	0,0572	0,8189	-1,8611	6,0000	0,1121	-0,0194	0,0104	-0,0449	0,0061
	No se han asumido varianzas iguales			-1,8611	5,9555	0,1124	-0,0194	0,0104	-0,0449	0,0062

Tabla 11: Resultados obtenidos con el programa SPSS de la estadística de los grupos control con las clip cages (1) y del grupo con el pulgón (2) en la prueba de 96 horas. Se indica el número de réplicas, las medias y la desviación típica.

Estadísticos de grupo

Tratamiento	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Asn 1,00	4	1,5858	,37835	,18917
2,00	4	1,0572	,46135	,23068
Asp 1,00	4	13,4136	2,21940	1,10970
2,00	4	8,0546	2,33217	1,16608
Ser 1,00	4	4,2941	,78031	,39015
2,00	4	4,6344	1,71423	,85712
Hyp 1,00	4	,2198	,03404	,01702
2,00	4	,1623	,05124	,02562
Gln 1,00	4	7,1092	2,56576	1,28288
2,00	4	3,3749	1,74889	,87445
Thr 1,00	4	2,5608	,81073	,40536
2,00	4	1,4458	,66101	,33051
Glu 1,00	4	4,2724	1,37850	,68925
2,00	4	1,8688	,81477	,40739
Ala 1,00	4	,4425	,21313	,10656
2,00	4	,1254	,09327	,04663
Pro 1,00	4	2,5563	,42768	,21384
2,00	4	1,3162	,46528	,23264
His 1,00	4	,5939	,29686	,14843
2,00	4	,3387	,08856	,04428
Lys 1,00	4	2,9729	,94534	,47267
2,00	4	1,7676	,53711	,26855
Arg 1,00	4	,9198	,69402	,34701
2,00	4	,3680	,15293	,07646
Val 1,00	4	2,7558	1,04183	,52091
2,00	4	1,3348	,50368	,25184
Met 1,00	4	,2256	,04434	,02217
2,00	4	,2314	,06482	,03241
Tyr 1,00	4	1,1066	,31426	,15713
2,00	4	,7897	,09268	,04634
Ile 1,00	4	1,5928	,52518	,26259
2,00	4	,8388	,24839	,12419
Leu 1,00	4	2,3685	1,55295	,77648
2,00	4	1,1016	,64640	,32320
Phe 1,00	4	1,3651	,37187	,18593
2,00	4	,8380	,18990	,09495
Trp 1,00	4	,5247	,07277	,03638
2,00	4	,4470	,06017	,03009
Cys 1,00	4	,4977	,01409	,00704
2,00	4	,4757	,01364	,00682

Tabla 12: Resultados estadísticos obtenidos con el programa SPSS para la comparación de medias de muestras independientes, en los aminoácidos de la prueba de 96 horas de los grupos control con clip cages y pulgón. Con el test de Levene se indican se las varianzas son iguales o no, en el caso de que sea significativo ($p > 0,05$), se asumen varianzas distintas. Para la prueba t, se mira el valor significativo según el test de Levene. En negrita se han marcado los datos utilizados para el trabajo, y los valores subrayados, indican los valores significativos.

Prueba de muestras independientes										
		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Superior	Inferior
Asn	Se han asumido varianzas iguales	0,1925	0,6762	1,7720	6,0000	0,1268	0,5286	0,2983	-0,2013	1,2586
	No se han asumido varianzas iguales			1,7720	5,7785	0,1287	0,5286	0,2983	-0,2082	1,2655
Asp	Se han asumido varianzas iguales	0,0034	0,9557	3,3291	6,0000	<u>0,0158</u>	5,3590	1,6097	1,4201	9,2978
	No se han asumido varianzas iguales			3,3291	5,9853	0,0159	5,3590	1,6097	1,4178	9,3001
Ser	Se han asumido varianzas iguales	2,2841	0,1815	-0,3613	6,0000	0,7303	-0,3403	0,9417	-2,6446	1,9641
	No se han asumido varianzas iguales			-0,3613	4,1920	0,7353	-0,3403	0,9417	-2,9084	2,2279
Hyp	Se han asumido varianzas iguales	0,5487	0,4868	1,8676	6,0000	0,1110	0,0574	0,0308	-0,0178	0,1327
	No se han asumido varianzas iguales			1,8676	5,2159	0,1184	0,0574	0,0308	-0,0206	0,1355
Gln	Se han asumido varianzas iguales	0,6439	0,4529	2,4052	6,0000	0,0529	3,7343	1,5526	-0,0647	7,5333
	No se han asumido varianzas iguales			2,4052	5,2928	0,0584	3,7343	1,5526	-0,1912	7,6598
Thr	Se han asumido varianzas iguales	0,2169	0,6578	2,1317	6,0000	0,0770	1,1150	0,5230	-0,1648	2,3947
	No se han asumido varianzas iguales			2,1317	5,7662	0,0789	1,1150	0,5230	-0,1775	2,4074
Glu	Se han asumido varianzas iguales	0,5824	0,4743	3,0021	6,0000	0,0239	2,4036	0,8006	0,4445	4,3627
	No se han asumido varianzas iguales			3,0021	4,8681	0,0311	2,4036	0,8006	0,3286	4,4786
Ala	Se han asumido varianzas iguales	1,4742	0,2703	2,7263	6,0000	<u>0,0344</u>	0,3171	0,1163	0,0325	0,6017
	No se han asumido varianzas iguales			2,7263	4,1084	0,0511	0,3171	0,1163	-0,0025	0,6367
Pro	Se han asumido varianzas iguales	0,0108	0,9208	3,9245	6,0000	<u>0,0078</u>	1,2401	0,3160	0,4669	2,0133
	No se han asumido varianzas iguales			3,9245	5,9579	0,0079	1,2401	0,3160	0,4656	2,0146
His	Se han asumido varianzas iguales	11,5034	<u>0,0146</u>	1,6474	6,0000	0,1506	0,2552	0,1549	-0,1238	0,6342
	No se han asumido varianzas iguales			1,6474	3,5298	0,1842	0,2552	0,1549	-0,1984	0,7088
Lys	Se han asumido varianzas iguales	2,1032	0,1972	2,2172	6,0000	0,0685	1,2054	0,5436	-0,1249	2,5356
	No se han asumido varianzas iguales			2,2172	4,7541	0,0802	1,2054	0,5436	-0,2141	2,6248
Arg	Se han asumido varianzas iguales	3,5416	0,1089	1,5529	6,0000	0,1714	0,5518	0,3553	-0,3177	1,4213
	No se han asumido varianzas iguales			1,5529	3,2906	0,2103	0,5518	0,3553	-0,5246	1,6282
Val	Se han asumido varianzas iguales	1,5325	0,2620	2,4559	6,0000	<u>0,0494</u>	1,4210	0,5786	0,0052	2,8367
	No se han asumido varianzas iguales			2,4559	4,3297	0,0652	1,4210	0,5786	-0,1383	2,9803

Prueba de muestras independientes										
		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Superior	Inferior
Met	Se han asumido varianzas iguales	0,2209	0,6550	-0,1470	6,0000	0,8879	-0,0058	0,0393	-0,1019	0,0903
	No se han asumido varianzas iguales			-0,1470	5,3037	0,8886	-0,0058	0,0393	-0,1050	0,0935
Tyr	Se han asumido varianzas iguales	2,6926	0,1519	1,9345	6,0000	0,1012	0,3169	0,1638	-0,0839	0,7178
	No se han asumido varianzas iguales			1,9345	3,5180	0,1348	0,3169	0,1638	-0,1636	0,7974
Ile	Se han asumido varianzas iguales	2,7374	0,1491	2,5958	6,0000	<u>0,0409</u>	0,7540	0,2905	0,0432	1,4648
	No se han asumido varianzas iguales			2,5958	4,2781	0,0564	0,7540	0,2905	-0,0322	1,5403
Leu	Se han asumido varianzas iguales	1,7669	0,2321	1,5062	6,0000	0,1827	1,2668	0,8411	-0,7912	3,3248
	No se han asumido varianzas iguales			1,5062	4,0092	0,2063	1,2668	0,8411	-1,0662	3,5998
Phe	Se han asumido varianzas iguales	1,2778	0,3015	2,5248	6,0000	<u>0,0450</u>	0,5271	0,2088	0,0163	1,0380
	No se han asumido varianzas iguales			2,5248	4,4651	0,0586	0,5271	0,2088	-0,0295	1,0837
Trp	Se han asumido varianzas iguales	0,2970	0,6054	1,6452	6,0000	0,1510	0,0777	0,0472	-0,0379	0,1932
	No se han asumido varianzas iguales			1,6452	5,7956	0,1528	0,0777	0,0472	-0,0388	0,1942
Cys	Se han asumido varianzas iguales	0,1392	0,7220	2,2532	6,0000	0,0652	0,0221	0,0098	-0,0019	0,0461
	No se han asumido varianzas iguales			2,2532	5,9937	0,0652	0,0221	0,0098	-0,0019	0,0461

8.2 Ensayo Azúcares

8.2.1 Rectas patrones de los azúcares

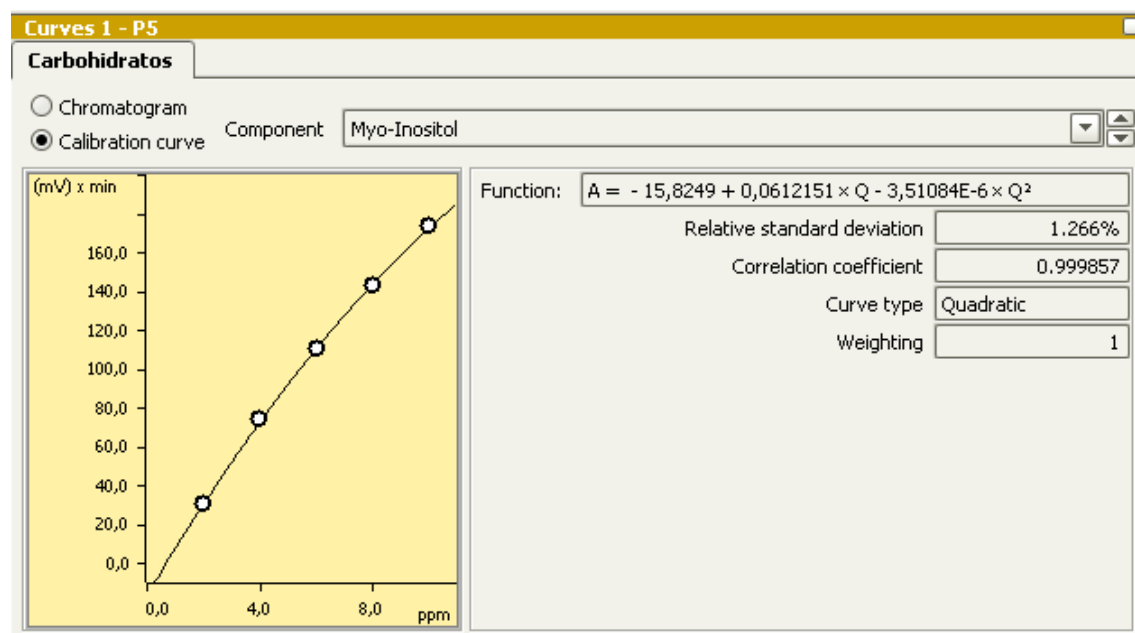


Figura 36: Recta patrón para mio-Inositol. Se muestra el coeficiente de correlación y la ecuación de la recta.

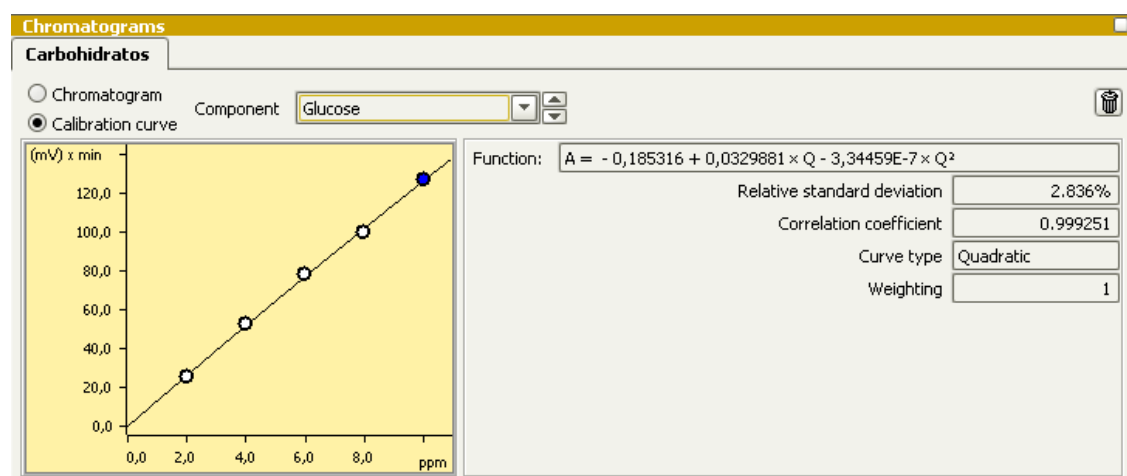


Figura 37: Recta patrón para glucosa. Se muestra el coeficiente de correlación y la ecuación de la recta.

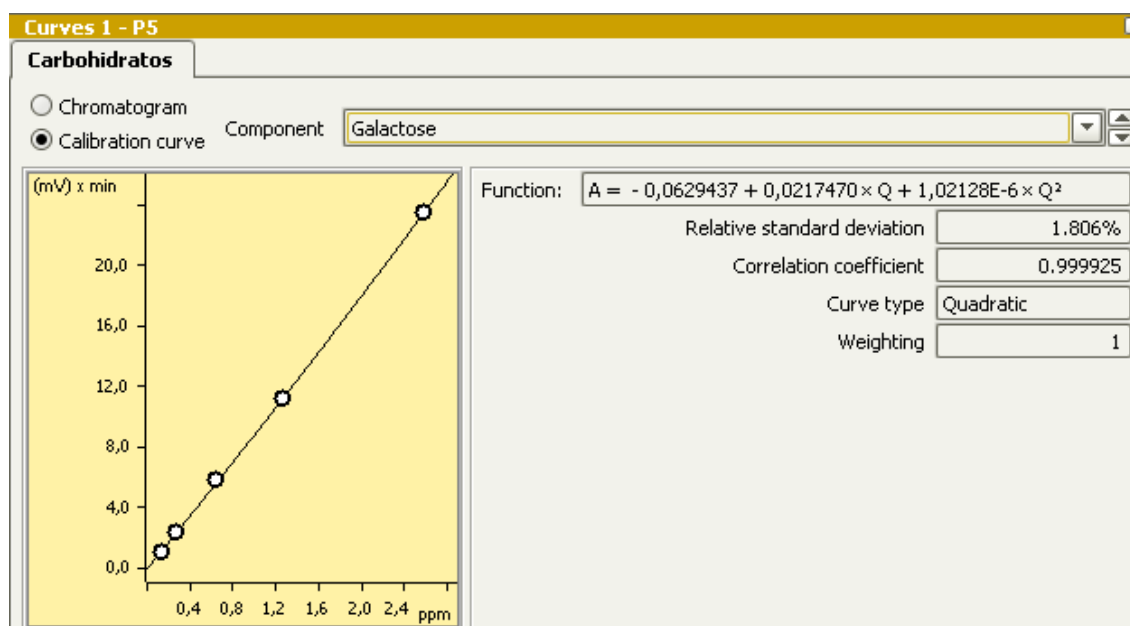


Figura 38: Recta patrón para galactosa. Se muestra el coeficiente de correlación y la ecuación de la recta.

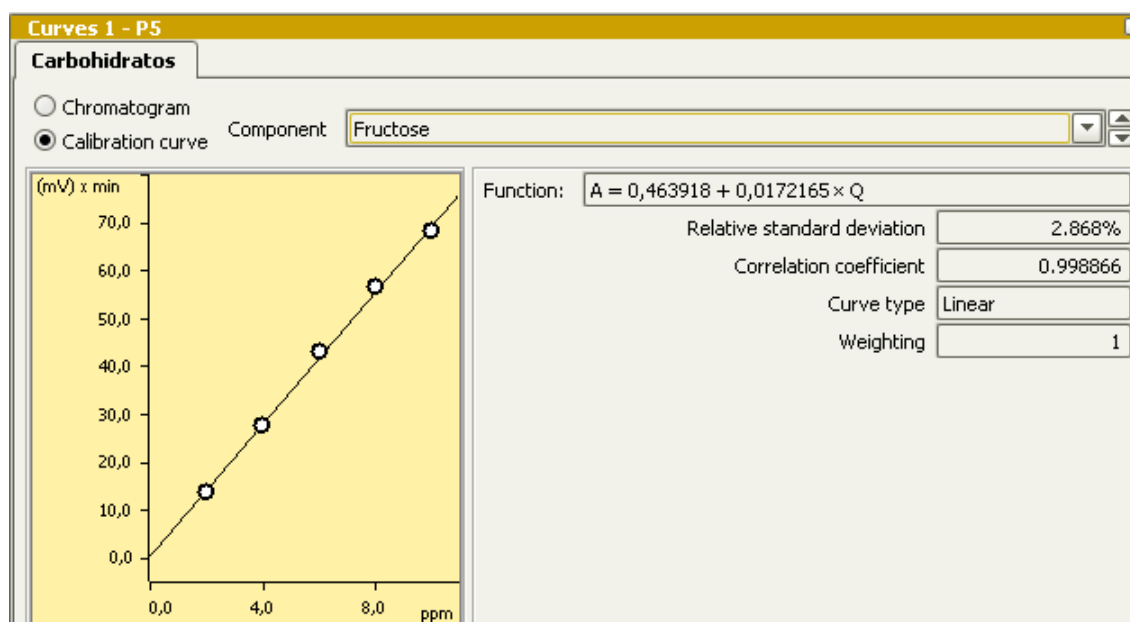


Figura 39: Recta patrón para fructosa. Se muestra el coeficiente de correlación y la ecuación de la recta.

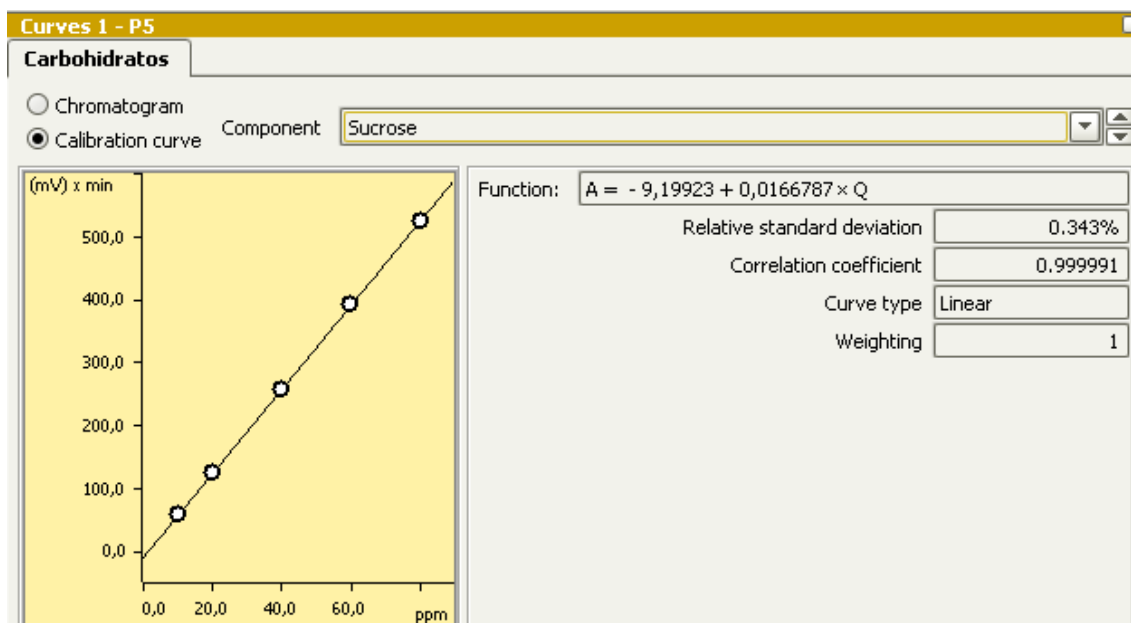


Figura 40: Recta patrón para sacarosa. Se muestra el coeficiente de correlación y la ecuación de la recta.

8.2.2 Concentraciones totales

Tabla 13: Concentraciones finales de los carbohidratos en todas las muestras del ensayo de 48 horas. También se incluyen sus respectivas medias y desviaciones estándar.

Tratamiento 48 horas	Mio-Inositol	Glucosa	Galactosa	Fructosa	Lactosa	Sacarosa
Control (C)	6,738	3,564	1,314	3,066	11,790	24,894
Control (C)	6,324	1,920	0,936	2,088	12,312	23,904
Control (C)	6,858	4,074	1,146	4,782	11,970	50,652
Control (C)	6,348	2,562	1,290	2,166	12,390	32,604
Pulgones (P)	5,742	1,218	0,714	0,648	12,264	17,994
Pulgones (P)	5,580	2,604	0,936	1,842	12,426	15,654
Pulgones (P)	5,676	2,256	0,936	1,848	12,294	24,822
Pulgones (P)	5,778	2,604	0,768	2,292	12,288	28,548

Tratamiento 48 horas	Mio-Inositol	Glucosa	Galactosa	Fructosa	Lactosa	Sacarosa
Controles	6,567	3,030	1,172	3,026	12,116	33,014
Desviación estándar C	0,271	0,971	0,174	1,252	0,283	12,385
Pulgones	5,694	2,171	0,839	1,658	12,318	21,755
Desviación estándar P	0,087	0,656	0,115	0,705	0,073	5,970

Tabla 14: Concentraciones finales de los carbohidratos en todas las muestras del ensayo de 48 horas. También se incluyen sus respectivas medias y desviaciones estándar.

Tratamiento 96 horas	Mio-Inositol	Glucosa	Galactosa	Fructosa	Lactosa	Sacarosa
Control (C)	4,676	7,348	0,784	7,152	9,060	63,140
Control (C)	4,804	8,728	1,228	8,324	8,356	62,128
Control (C)	4,792	5,800	0,688	5,692	8,200	96,484
Control (C)	5,676	7,128	0,912	6,412	8,128	117,120
Pulgones (P)	5,208	12,752	0,872	12,760	8,316	157,168
Pulgones (P)	4,116	6,692	0,640	6,472	8,476	51,808
Pulgones (P)	4,172	8,004	0,856	7,660	7,764	107,676
Pulgones (P)	4,492	12,252	1,128	11,812	8,120	224,284

Tratamiento 96 horas	Mio-Inositol	Glucosa	Galactosa	Fructosa	Lactosa	Sacarosa
Controles	4,987	7,251	0,903	6,895	8,436	84,718
Desviación estándar C	0,463	1,199	0,235	1,124	0,427	26,859
Pulgones	4,497	9,925	0,874	9,676	8,280	105,645
Desviación estándar P	0,502	3,030	0,200	3,077	0,307	73,327

8.2.3 Resultados estadísticos

Tabla 15: Resultados obtenidos con el programa SPSS del test de la t entre los grupos controles (0) y pulgón (1) del tratamiento de 48 horas del ensayo. Se indica el número de réplicas, las medias y la desviación típica.

Estadísticos de grupo

Tratamiento	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Inositol ,00	4	6,5670	,27137	,13569
1,00	4	5,6940	,08695	,04347
Glucosa ,00	4	3,0300	,97060	,48530
1,00	4	2,1705	,65585	,32792
Galactosa ,00	4	1,1715	,17365	,08682
1,00	4	,8385	,11472	,05736
Fructosa ,00	4	3,0255	1,25228	,62614
1,00	4	1,6575	,70522	,35261
Sacarosa ,00	4	33,0135	12,38539	6,19269
1,00	4	21,7545	5,96989	2,98494

Tabla 16: Resultados estadísticos obtenidos con el programa SPSS para la comparación de medias de muestras independientes, en los carbohidratos del ensayo de 48 horas, entre los controles y pulgones. Con el test de Levene se indican se las varianzas son iguales o no, en el caso de que sea significativo ($p > 0,05$), se asumen varianzas distintas. Para la prueba t, se mira el valor significativo según el test de Levene. En negrita se han marcado los datos utilizados para el trabajo, y los valores subrayados, indican los valores significativos.

Prueba de muestras independientes										
Tratamiento 48 Horas		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Superior	Inferior
Mio-Inositol	Se han asumido varianzas iguales	25,6356	<u>0,0023</u>	6,1271	6,0000	0,0009	0,8730	0,1425	0,5244	1,2216
	No se han asumido varianzas iguales			6,1271	3,6095	<u>0,0050</u>	0,8730	0,1425	0,4599	1,2861
Glucosa	Se han asumido varianzas iguales	1,6318	0,2487	1,4675	6,0000	0,1926	0,8595	0,5857	-0,5737	2,2927
	No se han asumido varianzas iguales			1,4675	5,2669	0,1993	0,8595	0,5857	-0,6234	2,3424
Galactosa	Se han asumido varianzas iguales	0,5492	0,4866	3,2001	6,0000	<u>0,0186</u>	0,3330	0,1041	0,0784	0,5876
	No se han asumido varianzas iguales			3,2001	5,1998	0,0227	0,3330	0,1041	0,0686	0,5974
Fructosa	Se han asumido varianzas iguales	0,9549	0,3662	1,9037	6,0000	0,1056	1,3680	0,7186	-0,3903	3,1263
	No se han asumido varianzas iguales			1,9037	4,7289	0,1186	1,3680	0,7186	-0,5115	3,2475
Sacarosa	Se han asumido varianzas iguales	1,1431	0,3261	1,6378	6,0000	0,1526	11,2590	6,8745	-5,5624	28,0804
	No se han asumido varianzas iguales			1,6378	4,3226	0,1715	11,2590	6,8745	-7,2789	29,7969

Tabla 17: Resultados obtenidos con el programa SPSS del test de la t en los grupos control (0) y pulgón (1) en el tratamiento de 96 horas del ensayo. Se indica el número de réplicas, las medias y la desviación típica.

Estadísticos de grupo

Tratamiento		N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Inositol	,00	4	4,9870	,46295	,23147
	1,00	4	4,4970	,50211	,25105
Glucosa	,00	4	7,2510	1,19881	,59941
	1,00	4	9,9250	3,03037	1,51518
Galactosa	,00	4	,9030	,23530	,11765
	1,00	4	,8740	,19967	,09983
Fructosa	,00	4	6,8950	1,12377	,56189
	1,00	4	9,6760	3,07698	1,53849
Sacarosa	,00	4	84,7180	26,85918	13,42959
	1,00	4	135,2340	73,32654	36,66327

Tabla 18: Resultados estadísticos obtenidos con el programa SPSS para la comparación de medias de muestras independientes, en los carbohidratos del ensayo de 96 horas. Con el test de Levene se indican si las varianzas son iguales o no, en el caso de que sea significativo ($p > 0,05$), se asumen varianzas distintas. Para la prueba t, se mira el valor significativo según el test de Levene. En negrita se han marcado los datos utilizados para el trabajo, y los valores subrayados, indican los valores significativos.

Prueba de muestras independientes										
Tratamiento 96 Horas		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Superior	Inferior
Mio-Inositol	Se han asumido varianzas iguales	0,0035	0,9550	1,4349	6,0000	0,2013	0,4900	0,3415	-0,3456	1,3256
	No se han asumido varianzas iguales			1,4349	5,9609	0,2016	0,4900	0,3415	-0,3469	1,3269
Glucosa	Se han asumido varianzas iguales	13,6361	<u>0,0102</u>	-1,6411	6,0000	0,1519	-2,6740	1,6294	-6,6611	1,3131
	No se han asumido varianzas iguales			-1,6411	3,9165	0,1776	-2,6740	1,6294	-7,2363	1,8883
Galactosa	Se han asumido varianzas iguales	0,1752	0,6901	0,1879	6,0000	0,8571	0,0290	0,1543	-0,3486	0,4066
	No se han asumido varianzas iguales			0,1879	5,8452	0,8573	0,0290	0,1543	-0,3510	0,4090
Fructosa	Se han asumido varianzas iguales	17,8330	<u>0,0055</u>	-1,6979	6,0000	0,1404	-2,7810	1,6379	-6,7888	1,2268
	No se han asumido varianzas iguales			-1,6979	3,7863	0,1688	-2,7810	1,6379	-7,4315	1,8695
Sacarosa	Se han asumido varianzas iguales	3,3264	0,1180	-1,2938	6,0000	0,2433	-50,5160	39,0455	-146,0568	45,0248
	No se han asumido varianzas iguales			-1,2938	3,7908	0,2689	-50,5160	39,0455	-161,3243	60,2923